



Détermination du mécanisme d'entrée du rotavirus, impliquant la glycoprotéine VP7 par RMN

Sarah Elaid

► To cite this version:

Sarah Elaid. Détermination du mécanisme d'entrée du rotavirus, impliquant la glycoprotéine VP7 par RMN. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2013. Français. NNT : 2013PA05P603 . tel-01124091

HAL Id: tel-01124091

<https://theses.hal.science/tel-01124091>

Submitted on 6 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS DESCARTES
FACULTÉ DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES
ÉCOLE DOCTORALE MEDICAMENT, TOXICOLOGIE, CHIMIQUE
ET ENVIRONNEMENT (ED 436)

Spécialité : Biophysique Biochimie Structurale et Fonctionnelle

Présentée par
Sarah ELAID

En vue de l'obtention du grade de
Doctorat de l'Université Paris Descartes

Détermination du mécanisme d'entrée du Rotavirus
impliquant la glycoprotéine VP7 par RMN

Soutenue le 15 Février 2013 devant le Jury composé de :

Monsieur Bernard Delmas	Rapporteur
Monsieur Francois Penin	Rapporteur
Madame Isabel Alves	Examinatrice
Monsieur Frédéric Dardel	Examineur
Monsieur Jean Lepault	Examineur
Monsieur Serge Bouaziz	Directeur de Thèse

Remerciements

Je tiens à remercier dans un premier temps, les membres de mon jury de thèse qui m'ont fait l'honneur d'évaluer mon manuscrit. Je remercie donc Messieurs Bernard Delmas et François Penin d'avoir accepté d'être rapporteurs et Madame Isabel Alves et Monsieur Jean Lepault, en tant qu'examineurs.

Mes remerciements chaleureux à Monsieur Frédéric Dardel, qui malgré ses lourdes responsabilités en tant que Président de l'Université Paris Descartes, me fait l'honneur d'accepter de participer à ce jury.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, Monsieur Serge Bouaziz, de m'avoir accueillie au sein de son équipe et de m'avoir fourni les moyens nécessaires au bon déroulement du présent travail, de la confiance qu'il m'a accordée tout au long du projet, de son encadrement tout en me laissant évoluer librement dans mes recherches, de sa patience et de son aide pour la correction de ce rapport.

Ma reconnaissance va tout particulièrement à Nelly Morellet qui m'a initiée à la RMN et pour sa patience, sa disponibilité et son enthousiasme.

Je tiens à remercier chaleureusement Pascale Coric pour ses conseils, son aide et pour sa contribution à la correction de mon manuscrit de thèse. Malgré son emploi du temps surchargé, elle n'a pas hésité à m'apporter son aide lors des problèmes rencontrés.

Je remercie Serge Turcaud pour son aide précieuse lors des problèmes rencontrés avec la HPLC et pour le temps important qu'il a consacré à la synthèse du dérivé du cholestérol.

Mes remerciements s'adressent également à Edith Gincel pour son aide précieuse.

J'associe également à ces remerciements Rodrigue Marquant, qui m'a initiée à la synthèse peptidique.

Ce travail de thèse a débuté dans le laboratoire de Pharmacologie Chimique et Génétique de la Faculté de Pharmacie à Université Paris Descartes puis s'est déroulé en grande partie dans le laboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques, CNRS UMR 8015. Je tiens à remercier tous les membres de ce laboratoire.

Je remercie aussi toutes les personnes avec qui j'ai pu travailler et collaborer, Bernard Desbat pour les expériences de ATR-FTIR et Isabel Alves qui m'a appris l'art délicat de la résonance plasmonique aux ondes guidées (PWR) et pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre collaboration.

Cette thèse a bénéficié du soutien financier de la région Île-de-France, dans le cadre du DIM-Malinf. Elle n'aurait pas été possible sans la collaboration de Sonia Libersou, Malika

Ouldali et Jean Lepault du Laboratoire de Virologie Moléculaire et Structurale, Gif sur Yvette. Je tiens à les remercier pour leur accueil chaleureux et pour nous avoir proposé ce projet qui avait fait l'objet de mon stage de master 2.

J'adresse mes remerciements à toute l'équipe de Chimie et Biologie des Membranes et des Nano-objets pour leur accueil chaleureux, leur sens critique, leur compétence, leur dynamisme.

Je tiens à remercier toutes les personnes que j'ai pu côtoyer durant ces années, qui ont contribué de près ou de loin à ce travail et en particulier Maxime Gemmrich.

Enfin, je ne terminerai pas ces remerciements sans quelques mots pour mes proches, ce travail est aussi en partie le votre et je suis fier de le partager avec vous, merci.

A mes parents,

Introduction des travaux de thèse

Le rotavirus, agent de diarrhées infectieuses d'origine virale de la famille des Reoviridae, engendre des pertes économiques considérables aussi bien dans le secteur agronomique que dans celui de la santé. Ce virus hautement contagieux, fut découvert en 1973 dans des biopsies duodénales d'enfants diarrhéiques, par Bishop (Melbourne, Australie). Il affecte aussi bien les enfants des pays industrialisés que ceux des pays en voie de développement où il est l'une des causes principales de mortalité infantile.

Les rotavirus, ont un génome constitué de 11 segments d'ARN bicaténaires. La capside virale est constituée de trois couches protéiques et possède une symétrie icosaédrique $T=13$ de type *laevo*. Le core est constitué de 60 dimères de VP2 qui adoptent une symétrie triangulaire $T=1$ et interagissent, par le biais d'interactions majoritairement hydrophobes, avec la capside intermédiaire formée de trimères de VP6. La couche externe est constituée de 60 trimères de spicules de VP4 et de 260 trimères de VP7 stabilisés par les ions calcium.

Le calcium a un rôle important dans la stabilisation de la capside externe. En effet la baisse de la concentration en calcium en deçà d'une concentration critique induit la dissociation de la capside externe, libérant ainsi les particules virales infectieuses (DLPs) transcriptionnellement actives. Il a été montré que des fragments tryptiques de VP7 induisaient la déstabilisation des membranes de liposomes et ont suggéré une entrée du rotavirus par un mécanisme d'endocytose impliquant les fragments tryptiques de VP7.

Contrairement aux virus enveloppés, le mécanisme de translocation de la particule dans le cytoplasme reste toujours mal connu. Le travail effectué au cours de ma thèse a consisté, dans un premier temps à identifier les fragments tryptiques de VP7 susceptibles d'interagir avec les membranes et les déstabiliser. Nous avons ensuite caractérisé par des approches biophysiques et biochimiques, l'activité de ces différents fragments tryptiques sur des membranes modèles et étudié leur possible implication dans l'entrée du rotavirus par endocytose calcium-dépendante. L'étude structurale par RMN des différents fragments tryptiques a été entreprise pour comprendre plus finement la nature des interactions entre les membranes et ces peptides. Suite à nos résultats, nous proposons un mécanisme d'entrée du rotavirus permettant d'expliquer les effets observés sur les membranes biologiques.

Abréviations

6-CF : 6-Carboxyfluorescéine

Acm : Acetamidomethyl.

AMBER : Assisted Model Building with Energy Refinement

ARIA : Ambiguous Restraints in Iterative Assignment

DDAB : Le didécyldiméthylammonium bromide

Boc : tert Butoxycarbonyl.

CD : circular dichroism (dichroïsme circulaire)

CD₃OH : méthanol

CDCl₃ : chloroforme

CNS : Cristallography and NMR Systeme

COSY : COrrrelation SpectroscopY

DCC : N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide

DCU : N,N'-Dicyclohexylurea

DHPC (06:0 PC) : 1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

DMPC (14:0 PC) : 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

DPC : dodécylphosphocholine

EDT : Ethanedithiol

Egg PC : L- α -phosphatidylcholine (Egg, Chicken)

Fmoc : 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl.

HOBT : N-Hydroxybenzotriazole

HPLC : High Performance Liquid Chromatography (chromatographie en phase liquide
à haute pression)

it₀ : Iteration 0

it₈ : Itération 8

LUVs : vésicules larges unilamellaires (large unilamellar vesicle)

MALDI-TOF : Désorption Ionisation Laser Assistée par Matrice-Temps de Vol

MLV : multilamellar vesicle (vésicule multi-lamellaire)

Mtr : 4-methoxy-2, 3, 6-trimethylbenzenesulphonyl.

NMP : N-Méthyl-2-pyrrolidone

NOE : Nuclear Overhauser Effect

NOESY : Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
Pbf : 2, 2, 4, 6, 7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-Sulfonyl.
PBS : phosphate buffer saline (Tampon phosphate salin)
Pmc : 2, 2, 5, 7, 8 – pentamethylchroman-6-sulfonyl.
PWR : Plasmon-waveguide resonance spectroscopy
RDC : Residual Dipolar Coupling
RDC : Residual Dipolar Coupling
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
RX : Rayons X
SPR : Surface Plasmon Resonance Spectroscopy
t-Bu : Tert-butyle.
TFA : d'acide trifluoroacétique
Tis : Triisopropylsilane
Tmob : 8-2, 4, 6-timethoxybenzyl.
TOCSY : Total Correlation Spectroscopy
Trt : Triphenylmethyl.

TABLE DES MATIÈRES

I. Introduction générale	23
I.1 Le Rotavirus.....	23
I.1.1. Historique.....	23
I.1.2. Pathologies associées au rotavirus	23
I.1.3. La particule virale	24
I.1.3.1 Propriétés physico-chimiques.....	24
I.1.3.2 Composition	25
I.1.3.3 Structure de la particule virale.....	25
I.1.3.3.1. Structure à basse résolution	25
I.1.3.3.2. Les pseudo-particules virales.....	27
I.1.3.3.3. Modèle atomique de la particule virale	28
I.1.4. Les protéines virales.....	29
I.1.4.1 Les protéines non structurales	29
I.1.4.1.1. NSP1, une protéine accessoire.....	29
I.1.4.1.2. NSP2, une ATPase.....	29
I.1.4.1.3. NSP3, induit l'inhibition de la synthèse des protéines cellulaires	30
I.1.4.1.4. NSP4, un récepteur pour la particule virale.....	31
I.1.4.1.5. NSP5, une protéine kinase.....	32
I.1.4.1.6. NSP6, protéine d'interaction avec les acides nucléiques	32
I.1.4.2 Les protéines structurales.....	32
I.1.4.2.1. VP1, l'ARN polymérase.....	32
I.1.4.2.2. VP2, la protéine de structure.....	33
I.1.4.2.3. VP3, la guanyltransférase	34
I.1.4.2.4. VP4, la protéine de spicules	34
I.1.4.2.5. VP6, la protéine de la capside intermédiaire.....	37
I.1.4.2.6. VP7, la glycoprotéine externe	41
I.1.5. Cycle viral	45
I.1.6. Entrée du virus.....	47
I.1.6.1 Clivage de la protéine VP4 en VP8* et VP5*	47
I.1.6.2 L'attachement cellulaire.....	48
I.1.6.2.1. Interaction de VP8* avec l'acide sialique	48
I.1.6.2.2. Interaction de VP5* avec les intégrines $\alpha 2\beta 1$	48
I.1.6.2.3. Interaction de VP5* avec les protéines de choc thermique « Hsc70 »	49
I.1.6.2.4. Interaction de la protéine VP7 avec les intégrines $\alpha v\beta 3$	49
I.1.6.2.5. Interaction de la protéine VP7 avec les intégrines $\alpha x\beta 2$	49
I.1.6.3 Translocation des particules virales dans le cytoplasme	50
I.1.6.3.1. Entrée directe.....	50

I.1.6.3.2. Entrée par endocytose	51
I.2 Interactions peptides-membranes	53
I.2.1. Les propriétés des membranes et leur composition	53
I.2.1.1 Les membranes biologiques.....	53
I.2.1.1.1. Structure et compartimentation.....	53
I.2.1.1.2. Composition et asymétrie.....	55
I.2.1.1.2.1 Les glycérophospholipides	56
I.2.1.1.2.2 Les sphingolipides	58
I.2.1.1.2.3 Les stérols	59
I.2.1.2 Des molécules amphiphiles aux systèmes auto-organisés	61
I.2.1.3 Des membranes biologiques aux membranes modèles	63
I.2.2. Etudes mécanistiques des interactions peptides lytiques-membranes.....	65
I.2.2.1 Introduction	65
I.2.2.2 Les différents modes d'actions des peptides lytiques.....	66
I.2.2.2.1. Mécanisme de la formation des pores.....	67
I.2.2.2.1.1 Modèle du pore mixte ordonné ou désordonné « toroïdal pore ».....	67
I.2.2.2.1.2 Modèle du pore en tonneau « barrel-stave model »	67
I.2.2.2.1.3 Le modèle du radeau coulant « sinking-raft model »	68
I.2.2.2.2. Mécanisme de formation des micelles	69
I.2.2.2.2.1 Le modèle du tapis ou détergent « carpet-like model »	69
II. Matériels et Méthode.....	73
II.1.1. Recherche de région membranaire	73
II.1.2. Identification des sites de maturation par la trypsine	73
II.1.3. Synthèse peptidique en phase solide, purification et caractérisation des différents fragments	74
II.1.3.1 Cycle de synthèse peptidique.....	75
II.1.3.1.1. Chargement de la résine	75
II.1.3.1.2. Déprotection de la fonction alpha amine.....	75
II.1.3.1.3. Activation du groupement alpha carboxylique.....	76
II.1.3.1.4. Couplage des acides aminés	77
II.1.3.2 Clivage de la résine et déprotection des chaînes latérales	78
II.1.3.3 Purification des peptides par HPLC semi-préparative et analytique.....	79
II.1.3.4 Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF en mode réflecteur positif	79
II.1.4. Préparation des vésicules larges unilamellaires	81
II.1.4.1 Détermination de l'activité biologique.....	82
II.1.5. Etude par PWR de l'interaction des peptides avec des bicouches	85
II.1.5.1 Principe de la PWR.....	85
II.1.5.2 Avantage de la PWR.....	86

II.1.5.3	Application à l'étude d'interaction peptides-membranes	87
II.1.6.	Dichroïsme circulaire, technique spectroscopique utilisée pour la détection des structures secondaires	88
II.1.6.1	Historique	88
II.1.6.2	Principe général	89
II.1.6.3	Préparation des micelles de dodecylphosphocholine (DPC)	91
II.1.6.4	Préparation des petites vésicules unilamellaires (SUV)	92
II.1.7.	Etude structurale par RMN et modélisation moléculaire	92
II.1.7.1	Historique	92
II.1.7.2	Les paramètres RMN définissant la structure d'une protéine	93
II.1.7.2.1.	Le déplacement chimique	93
II.1.7.2.1.1	Les protons des chaînes latérales (non labiles)	94
II.1.7.2.1.2	Les proton H α	94
II.1.7.2.1.3	Les protons amides	95
II.1.7.2.2.	L'effet Overhauser nucléaire (NOE)	95
II.1.7.2.3.	Les liaisons hydrogènes	96
II.1.7.3	Acquisition et traitement des expériences RMN	96
II.1.7.4	Stratégies d'attribution	98
II.1.7.5	Détermination des structures secondaires	102
II.1.7.6	Détermination des structures par le logiciel ARIA	102
II.1.7.6.1.	Contraintes de distance ambiguës	103
II.1.7.6.2.	Le principe de fonctionnement de ARIA	103
II.1.7.6.2.1	Le champ de force	105
II.1.7.6.2.1.1	Energies potentielles d'interactions liées	105
II.1.7.6.2.1.2	Energies potentielles d'interactions non liées	105
II.1.7.6.2.2	La calibration des pics NOEs	105
II.1.7.6.2.3	Attribution des pics NOE ambigus	106
II.1.7.6.2.4	Analyse et sélection des structures	107
III.	Résultats	113
III.1	Identification des régions membranaires potentielles dans la glycoprotéine VP7 et caractérisation de l'accessibilité des sites de maturation par la trypsine	113
III.1.1.	Objectifs	113
III.1.2.	Identification des régions membranaires	113
III.1.3.	Caractérisation des sites de maturation par la trypsine de la glycoprotéine VP7	116
III.1.4.	Synthèse des différents fragments de la glycoprotéine VP7, issus de la maturation par la trypsine	117
III.1.5.	Discussion et conclusion	121

III.2 Caractérisation de l'activité biologique des différents peptides dérivés de la glycoprotéine VP7 après maturation par la trypsine.....	125
III.2.1. Objectif	125
III.2.2. Interaction des peptides dérivés de la glycoprotéine VP7 avec les membranes modèles de vésicules larges unilamellaires (LUVs)	126
III.2.2.1 Interaction des peptides dérivés de la glycoprotéine VP7 avec les vésicules large unilamellaires d'Egg PC	126
III.2.2.2 Comparaison de l'effet des peptides dérivés de la glycoprotéine VP7 sur les membranes modèles de vésicules larges unilamellaires d'Egg PC	127
III.2.2.3 Effet de la concentration en peptide VP7 ₂₃ sur la perméabilisation des vésicules larges unilamellaires d'Egg PC.....	130
III.2.2.4 Effet de la composition lipidique des vésicules larges unilamellaires, sur l'efficacité du peptide VP7 ₂₃ à déstabiliser les membranes	131
III.2.2.5 Le cholestérol joue un rôle dans l'efficacité d'interaction du peptide VP7 ₂₃ avec les membranes modèles	133
III.2.3. Etudes par PWR de l'interaction des peptides dérivés de la glycoprotéine VP7 avec les bicouches lipidiques supportées	136
III.2.3.1 Préparation des bicouches supportées à la surface du cristal de PWR.....	137
III.2.3.2 Etudes par PWR de l'interaction des peptides avec les bicouches lipidiques d'Egg PC supportées	138
III.2.3.2.1. Interaction du peptide VP7 ₆₁ avec la bicouche d'Egg PC	139
III.2.3.2.2. Interaction du peptide VP7 ₄₃ avec la bicouche d'Egg PC	140
III.2.3.2.3. Interaction du peptide VP7 ₃₆ avec la bicouche d'Egg PC	141
III.2.3.2.4. Interaction du peptide VP7 ₂₃ avec la bicouche d'Egg PC	142
III.2.3.3 Détermination des constantes d'affinité des peptides dérivés de la glycoprotéine VP7 pour les bicouches d'Egg PC par PWR	145
III.2.3.4 L'effet du cholestérol sur l'efficacité d'interaction des peptides avec les bicouches supportées à la surface du cristal de PWR.....	146
III.2.3.5 Contribution électrostatique sur l'efficacité des peptides VP7 ₆₁ et VP7 ₃₆ à déstabiliser les membranes modèles.....	148
III.2.4. Discussion et conclusions.....	150
III.3 Caractérisation structurale du domaine minimum d'interaction avec les membranes, dérivé de la glycoprotéine VP7 après maturation par la trypsine	155
III.3.1. Objectif	155
III.3.2. Détermination des éléments de structures secondaires présents dans le domaine minimum d'interaction, VP7 ₂₃ , avec les membranes modèles par dichroïsme circulaire	156
III.3.2.1 Etude de la structuration par dichroïsme circulaire dans les SUVs.....	156

III.3.3. Etude structurale par résonance magnétique nucléaire (RMN)	159
III.3.3.1 Détermination des conditions de mise en solution du peptide VP7 ₂₃ , pour l'étude RMN	159
III.3.3.2 Détermination de la structure 3D du peptide VP7 ₂₃ par RMN dans un mélange CD ₃ OH/CDCl ₃ (1/1)	161
III.3.3.2.1. Détermination des contraintes RMN	161
III.3.3.2.2. Modélisation moléculaire sous contraintes RMN.....	164
III.3.3.2.2.1 Analyse des structures obtenues	167
III.3.3.2.2.2 Caractéristiques structurales de l'hélice α (W292-M210)	169
III.3.3.3 Détermination de la structure 3D du peptide VP7 ₂₃ dans des micelles de DPC, par RMN.	170
III.3.3.3.1. Détermination des contraintes RMN	170
III.3.3.3.2. Modélisation moléculaire sous contraintes RMN.....	175
III.3.3.3.3. Caractéristiques structurales de l'hélice α (W292-M210)	178
III.3.4. Comparaison de la structure du domaine VP7 ₂₃ déterminée par RMN et de son équivalent dans la structure cristallographique.....	179
III.4 Effet des mutations du peptide VP7₂₃ sur sa capacité à déstabiliser les membranes	181
III.4.1. Objectif	181
III.4.2. Prédiction des structures secondaires	182
III.4.3. Interaction des peptides mutants avec les membranes modèles des vésicules larges unilamellaires d'Egg PC	183
III.4.4. Etude de la structuration du peptide mutant VP7 ₂₃ Y302P par dichroïsme circulaire	184
III.4.5. Détermination de la constante d'affinité du peptide VP7 ₂₃ Y302P pour les bicouches d'Egg PC par PWR	185
III.5 Discussion et conclusions	186
IV. Conclusions générales	197
V. Annexes	207
V.1 Déplacements chimiques du peptide VP7₂₃	207
V.1.1. Tableau des déplacements chimiques du peptide VP7 ₂₃ dans le DPC.....	207
V.1.2. Tableau des déplacements chimiques du peptide VP7 ₂₃ dans un mélange CD ₃ OH/CDCl ₃ (1/1).....	208
V.2 Analyse structurale et fonctionnelle des peptides VP7₆₁, VP7₄₃, et VP7₃₆ ..	209
V.2.1. Analyse fonctionnelle.....	209
V.2.2. Analyse structurale.....	210

V.2.2.1	Structure du peptide VP7 ₆₁	211
V.2.2.2	Structure du peptide VP7 ₄₃	213
V.2.2.3	Structure du peptide VP7 ₃₆	214
VI.	Bibliographie	219

Chapitre I: Introduction générale

I. Introduction générale

I.1 Le Rotavirus

I.1.1. Historique

Les rotavirus représentent la principale cause de diarrhée aiguë sévère dans le monde chez les jeunes enfants^{1,2}. Ces agents infectieux d'origine virale ont été découverts récemment³, contrairement aux bactéries et parasites qui ont été, pour certains, identifiés au 19^{ème} siècle. Néanmoins, l'hypothèse d'une étiologie virale était suspectée de longue date, lorsqu'il a été démontré que des ultra-filtrats extraits de selles de patients affectés de gastroentérite, ne contenant qu'un faible nombre de bactéries, pouvaient transmettre la maladie à des sujets sains. Puis dans les années 1950 à 1960, le développement de méthodes d'isolement de particules virales en culture cellulaire, a permis aux virologues d'identifier un certain nombre de ces virus. Cette technique fut hélas très décevante dans le cas de gastroentérites. Cependant, en 1963, l'utilisation de la microscopie électronique a permis à Adams et Kraft de déceler la présence de particules virales sphériques, dans l'épithélium intestinal de souriceaux infectés par le virus de la diarrhée épizootique (EDIM : Epizootic Diarrhea Infant Mice)³. À la suite de cette première découverte, d'autres virus répondant aux critères de la maladie ont été décrits chez diverses espèces animales. En 1967, Malherbe et Strickland-Cholmley ont mis en évidence la présence de particules virales nommées SA11 (Simian Agent 11) chez le singe⁴. Puis, en 1969, Mebus et al, ont identifié le NCDV (Nebraska Calf Diarrhea Virus) chez les veaux diarrhéiques⁵. Mais ce n'est qu'en 1973, que Bishop et son équipe du département de Gastro-entérologie du Royal Children's Hospital de Melbourne (Australie), ont découvert dans des biopsies duodénales d'enfants diarrhéiques⁶, des particules virales identiques au NCDV et ont rattaché ce virus au genre orbivirus. Finalement, en 1974, Flewet et son équipe ont révélé l'existence d'analogies antigéniques et morphologiques entre les virus humains et bovins⁷. Ils ont ainsi, proposé de les regrouper sous le nom de rotavirus, du latin « rota » signifiant roue, inspiré par leur forme en roue révélée par microscopie électronique. En 1979, le genre Rotavirus est instauré au sein de la famille Reoviridae.

I.1.2. Pathologies associées au rotavirus

Les principaux signes cliniques des infections au rotavirus sont des diarrhées, des vomissements, de la fièvre, l'abattement, l'anorexie et la déshydratation. L'infection des

entérocytes matures, au sommet des villosités de l'épithélium intestinal, par ces virus, entraîne la lyse des entérocytes. Il en résulte ainsi de nombreuses altérations microscopiques, telles que, l'atrophie des villosités intestinales, la dilatation du réticulum endoplasmique des entérocytes et l'hypertrophie des cryptes intestinales⁸.

Une diminution de l'activité des disaccharidases a été également décelée dans le cas d'une infection au rotavirus, conduisant ainsi, à une hausse de la concentration en lactose dans la lumière intestinale⁶. De plus, par microscopie confocale à balayage laser, Jourdan et al, ont pu montrer que l'infection par le rotavirus induit entre autres, des modifications importantes du cytosquelette, qui sont en corrélation avec la diminution de l'expression de la sucrase-isomaltase à la surface apicale des entérocytes^{9,10}.

L'infection au rotavirus a été longtemps considérée comme étant limitée au niveau de l'épithélium de l'intestin grêle. Cependant, la présence d'ARN viral, révélée par RT-PCR, transcription inverse suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne, dans le liquide céphalo-rachidien et le sérum des enfants affectés par le rotavirus, suggère que le virus s'échappe de l'intestin vers le système circulatoire sanguin^{11,12}. Cette hypothèse a été également extrapolée et confirmée chez les animaux^{11,13}.

I.1.3. La particule virale

I.1.3.1 Propriétés physico-chimiques

Les rotavirus sont caractérisés par un degré de résistance très important, qui leur permet de persister dans le milieu extérieur. De plus, des observations faites dans le milieu hospitalier, suite au développement des maladies nosocomiales, ont permis de mettre en évidence le rôle de l'environnement dans la transmission des infections à rotavirus¹⁴⁻¹⁶.

La particule virale (TLP) dont la densité est évaluée à 1.36 g/cm³, possède un pouvoir infectieux très élevé. La dose infectieuse du rotavirus est supposée proche de 10 à 100 particules¹⁷, néanmoins, dans l'absolu on estime qu'une particule virale peut suffire à déclencher une infection¹⁸. De ce fait, Il est d'autant plus probable que les particules virales qui résistent à l'environnement puissent infecter l'hôte. En effet les particules virales sont très stables à un pH s'étalant de 3 à 9 et aussi en conditions d'humidité relativement basse et haute.

Connues également, pour leur capacité à survivre dans la matière fécale pendant une longue période, ces particules virales sont inactives en présence de chlore¹⁹, d'ammonium quaternaire et d'hypochlorite. Néanmoins, les particules virales soumises à des températures

très élevées (chauffage à 50°C pendant 1h) deviennent inactives. En outre, les rotavirus sont inactifs en présence d'éthanol, de phénol, de formaldéhyde et de lysol, tandis que, le formaldéhyde à 37°C, l'hexachlorophène à 0.75% (1:3) et le n-chloro-tosylamide de sodium à 67% peuvent détruire les rotavirus²⁰.

I.1.3.2 Composition

La capside virale du rotavirus est constituée de trois couches concentriques de protéines. La couche la plus externe est formée des glycoprotéines VP7 (34/37.3 KDa) d'où émergent les protéines VP4 (86.5 KDa). On observe ensuite une couche intermédiaire de protéines VP6 (44.8 KDa), représentant près de 50 % du poids du virus. Puis on trouve la couche la plus interne, appelée core, résultant de l'assemblage des protéines VP2 (102 KDa), d'où percent vers l'intérieur, l'ARN polymérase virale « VP1 » (125 KDa) et la guanylyltransférase « VP3 » (98 KDa)^{21,22}. Il existe entre ces trois couches protéiques un réseau de cavités, qui permet l'extrusion de l'ARN_m néosynthétisé et assure également le passage de métabolites^{23,24}.

A l'intérieur de la capside, l'ARN génomique est réparti au niveau des 12 canaux de type I, selon une symétrie icosaédrique^{22,25,26}. Pesavento et al, ont montré que la condensation du génome varie en fonction des modifications du pH, qui affectent les interactions protéine-ARN²⁷. D'autre part, il est important de mentionner que le génome constitué de 11 segments d'ARN bicaténaire, code aussi pour six autres protéines non structurales, NSP1 à NSP6¹, synthétisées lors de l'infection virale et n'intervenant pas dans la structure de la particule virale.

I.1.3.3 Structure de la particule virale

I.1.3.3.1. Structure à basse résolution

L'observation par microscopie électronique et traitement d'images des particules non colorées et non fixées du rotavirus simien ont permis de montrer que ces particules de 765 Å de diamètre présentent une symétrie icosaédrique T=13 de type *laevo*²³. Une reconstruction à basse résolution de la structure tridimensionnelle du rotavirus établie par Yeager et al., à partir d'analyse d'images acquises par cryo-microscopie électronique, a permis de déterminer l'organisation générale du virus à une résolution de 37 Å et 26 Å²⁸ (Figure I.1.3.3.1.1).

Les principales caractéristiques de la particule virale sont les suivantes : la capside externe est constituée de 780 sous unités de VP7 et de 60 spicules de VP4 qui émergent au

moins de 100 Å à partir de la surface de la capside. Le rayon moyen de ces particules est estimé à 377 Å, la couche de VP7 présente à sa surface 132 canaux, de diamètre variant de 40 Å à 60 Å. Vient ensuite, la capside intermédiaire constituée de 260 trimères de VP6 et présentant également à sa surface des canaux, correspondant à ceux de la capside externe. Ces canaux sont classés en trois types selon leur localisation (Figure I.1.3.3.1.1):

- Canaux de type I : 12 canaux ont été localisés sur les axes icosaédriques d'ordre 5.
- Canaux de type II : au nombre de 60, ces canaux sont situés sur les axes locaux d'ordre 6 entourant les axes d'ordre 5.
- Canaux de type III : il existe 60 canaux de ce types autour des axes d'ordre 3.

La couche la plus interne, « core », d'un rayon moyen estimé à 255 Å a été attribuée aux trois protéines VP1, VP2 et VP3, en absence de données structurales déterminantes.

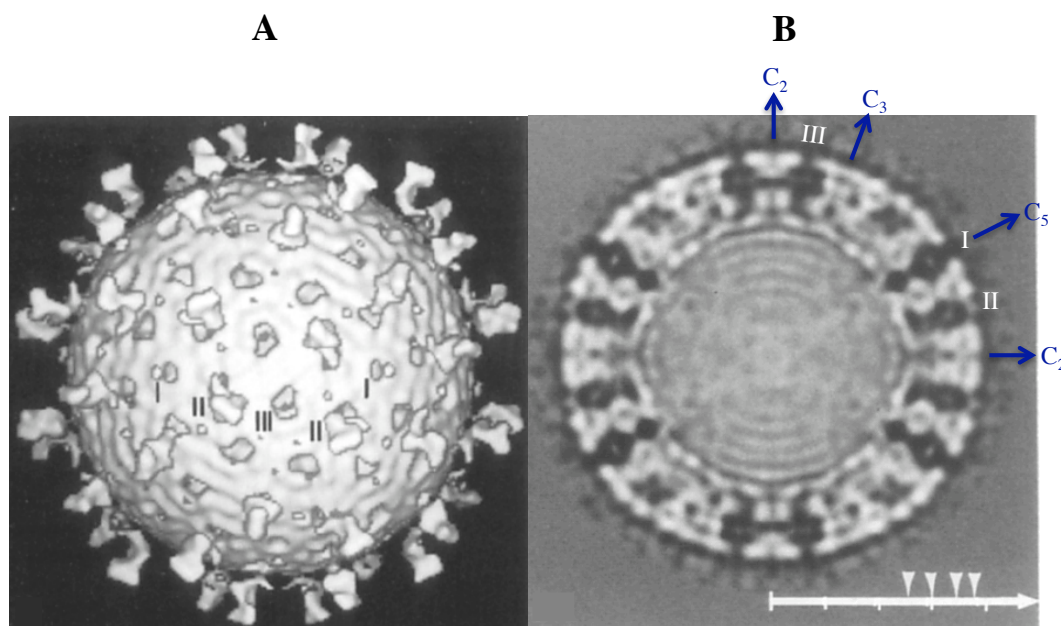


Figure I.1.3.3.1.1 : Reconstruction tridimensionnelle de la particule virale à partir d'images de cryo-microscopie électronique à basse résolution.

A. Vue selon l'axe deux de la particule virale à une résolution de 37 Å.

B. Coupe transversale de la particule virale à une résolution de 26 Å. Dans cette reconstruction les zones claires correspondent aux masses volumiques élevées. Les différents axes (C_2 : axe d'ordre 2 ; C_3 : axe d'ordre 3 ; C_5 : axe d'ordre 5) et les trois types de canaux (I, II, III) sont également représentés

I.1.3.3.2. Les pseudo-particules virales

Les pseudo-particules virales résultent de la capacité d'auto-assemblage des protéines virales. Selon les protéines qui les constituent, les pseudo-particules virales (VLP) présentent les mêmes propriétés structurales et fonctionnelles que les particules natives, mais sans leurs capacités répliquatives²⁹ et infectieuses. D'autre part, elles constituent un outil particulièrement intéressant pour les études structurales, fonctionnelles et immunologiques. En effet, des études effectuées sur des pseudo-particules virales recombinantes VP2/6, par cryo-microscopie électronique ont permis de montrer que la capside interne était constituée de 60 dimères asymétriques de la protéine VP2 (Figure I.1.3.3.2.1). Ces protéines organisées selon une triangulation $T=1$ interagissent avec le génome viral et les protéines structurales VP1 et VP3³⁰ d'après des études biochimiques³¹.

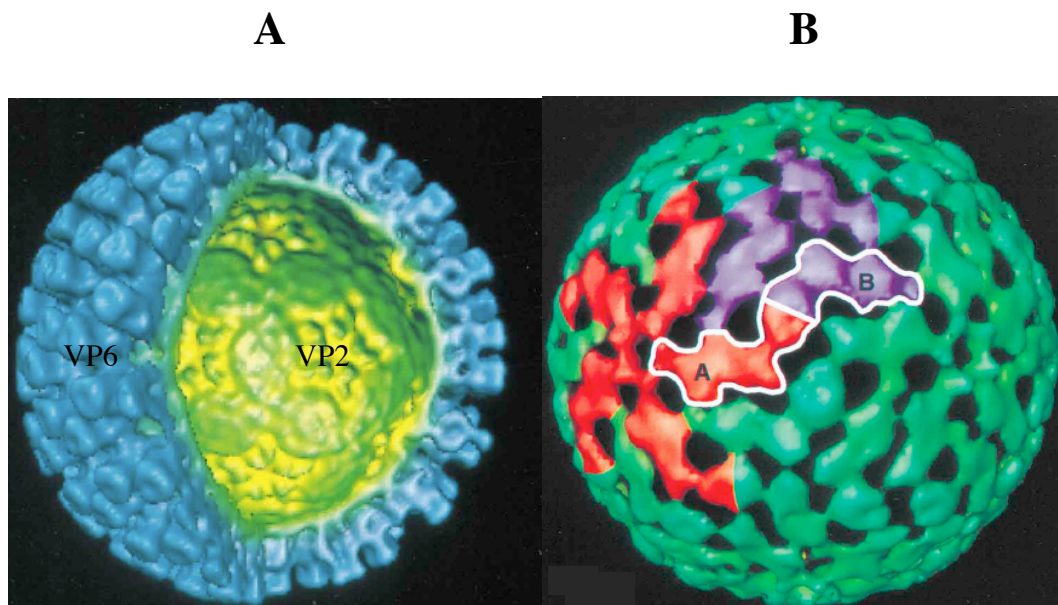


Figure I.1.3.3.2.1 : Structure tridimensionnelle des pseudo-particules virales VLP2/6 à une résolution de 22 Å (d'après Lawton et al., 1997).

A. coupe transversale partielle montrant la topologie de la surface intérieure du core VP2.

B. Topologie de surface du core VP2, montrant la constitution de cette couche en 60 dimères quasi-équivalents.

I.1.3.3.3. Modèle atomique de la particule virale

Les progrès des études effectuées par cryo-microscopie électronique et l'amélioration des procédures de traitement des données ont permis d'obtenir une description des particules virales à une résolution de 9.5 Å³². Ces études associées aux structures cristallographiques des différentes protéines, VP7³³, VP6³⁴, VP4³⁵⁻³⁷ et de la particule virale à double couche protéique³⁸ (DLP), ont révélé la complexité structurale de la capside et permis de mieux comprendre l'organisation du virion (Figure I.1.3.3.3.1).

La couche interne constituée de 60 dimères de VP2, interagit avec la capside intermédiaire (trimère de VP6) par le biais d'interactions majoritairement hydrophobes. Quant à la couche externe, elle est constituée de 260 trimères de VP7 stabilisés par les ions calcium et de 60 trimères de spicules de VP4 enfouies dans les canaux de types II. Chaque spicule de VP4 est en contact avec trois VP7 des six trimères entourant l'axe d'ordre 6 (canal de type II).

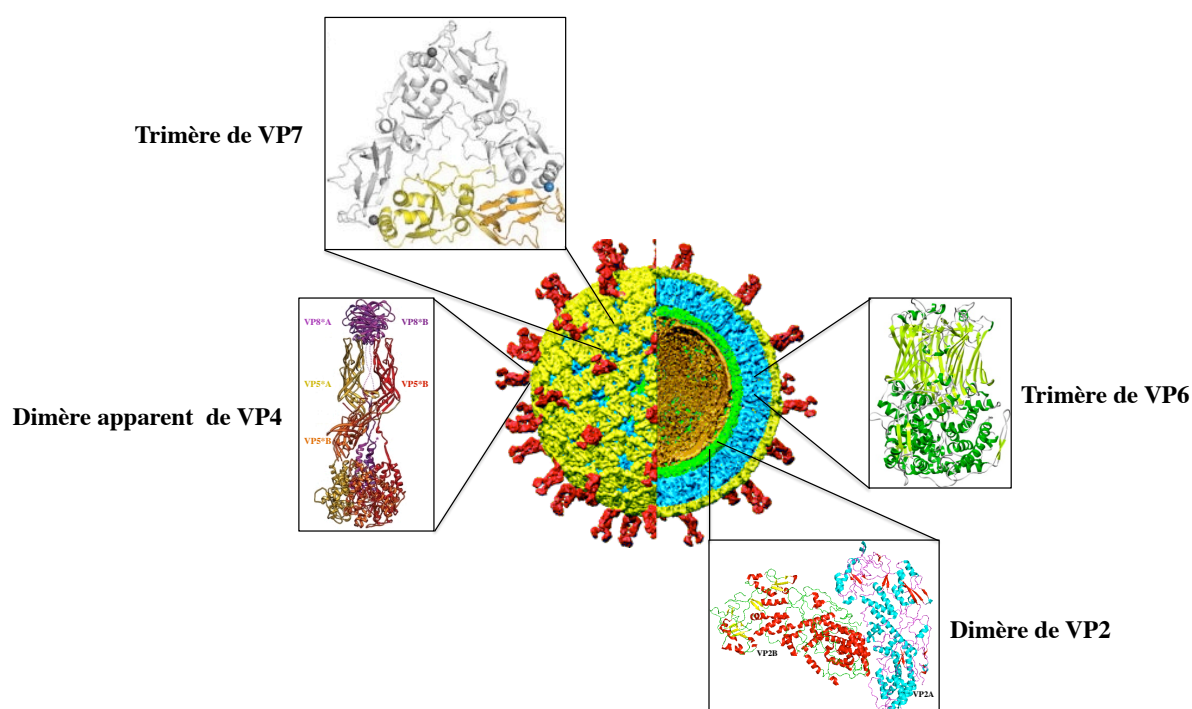


Figure I.1.3.3.3.1 : Reconstruction tridimensionnelle de la particule virale à partir d'images de cryo-microscopie électronique à une résolution de 9.5 Å (d'après Li et al., 2009).

La couche interne constituée par 60 dimères de VP2 est indiquée en vert. La couche intermédiaire formée par 260 trimères de VP6 est représentée en cyan. La couche externe est composée de 260 trimères de VP7 (en jaune) et de 60 spicules de VP4 (en rouge).

I.1.4. Les protéines virales

I.1.4.1 Les protéines non structurales

I.1.4.1.1. NSP1, une protéine accessoire

La protéine non structurale NSP1 est exprimée très tôt au cours du cycle viral à partir du gène 5³⁹. Cette molécule constituée de 495 aa (58.6 KDa) chez la souche SA11, de localisation cytoplasmique, est la moins conservée des protéines virales⁴⁰⁻⁴². L'interaction de la molécule NSP1 avec les protéines NSP2, NSP3, NSP5 et NSP6 a été démontrée par Gronzalez et al⁴³, cependant, aucune interprétation fonctionnelle n'a été apportée⁴³. D'autre part, le domaine N-terminal de la protéine comporte une séquence riche en cystéines, qui adopte une structure dite « en doigt de zinc », essentielle pour l'interaction avec l'ARNm^{40-42,44}.

De nombreux virus ont la capacité de contourner une partie des mécanismes effecteurs de l'immunité innée par inhibition d'un ou plusieurs composants du système d'interféron (IFN). Dans le cas du rotavirus, c'est la protéine NSP1 qui assure cette fonction en induisant la dégradation protéasome-dépendante du facteur de réponse à interféron 3 (IRF3), IRF5 et IRF7. Il résulte de cette dégradation l'inhibition de la transcription d'interférons IFN α/β de type I. De plus les travaux récents de Graff et al., ont permis de montrer que la protéine NSP1 inhibe également le facteur nucléaire Kappa B (NF κ B), protéine impliquée dans la réponse immunitaire, en induisant la dégradation protéasome-dépendante de la β -TrCP, β -transducin repeat containing protein⁴⁵.

I.1.4.1.2. NSP2, une ATPase

La protéine NSP2 exprimée à partir du gène 8 et d'un poids moléculaire moyen de l'ordre de 36.7 KDa est très conservée. Localisée dans les viroplasmes, inclusions virales, siège de la réplication virale, cette protéine ayant une conformation en anneau octamérique⁴⁶ possède une forte affinité pour les ARN double-brin (ARNdb) et les ARN simple-brin (ARNsb)^{47,48}. En effet, Aponte et al., ont détecté la protéine NSP2 associée aux ARNdb du complexe de réplication, comportant également les protéines virales NSP1, NSP5, VP1, VP2 et VP6^{43,48-51}. D'autre part, cette protéine est également essentielle pour la formation des viroplasmes^{48,50,52}, elle interagit avec la protéine NSP5 pour former des structures comparables aux viroplasmes⁵⁰.

La structure du complexe NSP2-NSP5 a été déterminée récemment par cryo-microscopie électronique. Cette structure a permis de montrer que l'ARNdb et la protéine NSP5 partagent le même site de fixation sur NSP2. De plus, contrairement à la protéine NSP5, la fixation de l'ARN au niveau des sillons d'octamères de NSP2, riches en résidus chargés positivement, induit un changement conformationnel de NSP2^{53,54}.

Une activité NTPase (RNA nucleoside triphosphatases), Mg^{2+} dépendante, a été également associée à la protéine NSP2. Elle a été mise en évidence par Taraporewala et al., en 1999⁵⁵. Les auteurs suggèrent que NSP2 pourrait agir comme « un moteur moléculaire » facilitant l'encapsidation des ARNm⁵⁶.

I.1.4.1.3. NSP3, induit l'inhibition de la synthèse des protéines cellulaires

Détectée durant les premières heures de l'infection au rotavirus, la protéine NSP3 est présente en grande quantité dans les cellules infectées. Cette protéine exprimée par le segment 7 est constituée de deux domaines fonctionnels. Le premier domaine localisé entre les résidus 4 et 149, correspond au domaine de liaison à l'extrémité 3' des ARNm viraux^{57,58}, permettant ainsi à la protéine d'assurer son rôle dans le transport spécifique des ARNm vers les sites d'encapsidation et de réplication. Le second domaine fonctionnel, permet la fixation du facteur d'initiation de la traduction eucaryote (eIF4GI)^{59,60}. De plus, Il a été démontré que l'interaction de NSP3 avec eIF4GI, induit le déplacement de la polyA binding protein (PAPB) du complexe d'initiation de la traduction eIF4F qui comporte eIF4G, eIF4A et eIF4E et qui s'accumule dans le noyau des cellules infectées par le rotavirus⁶¹. En outre, les deux domaines sont séparés par un domaine de dimérisation. L'existence de multimères de NSP3 a été révélée par analyse des gels d'électrophorèse SDS-PAGE en conditions non réductrices. D'autre part, les expériences en double hybride effectuées par Piron et al., ont permis de situer ce domaine de dimérisation entre les résidus 150 et 206⁶⁰.

Les travaux de Vitour et al., en 2004 ont abouti à l'identification d'un partenaire cellulaire de la protéine NSP3, la protéine RoXaN⁶², Rotavirus X-associated Non-structural protein, dont l'expression a été corrélée aux tumeurs stromales digestives⁶³. Il semble que cette protéine soit impliquée dans la régulation de la traduction en formant un complexe ternaire avec les protéines NSP3 et eIF4G. Il a été démontré également par Harb et al., que la localisation nucléaire de la PAPB est non seulement dépendante de la capacité de NSP3 à interagir avec eIF4G mais exige surtout l'interaction de NSP3 avec une région spécifique de RoXaN appelée RoXaN LD car il s'agit d'un domaine riche en leucines et acides aspartiques. De plus, Ils ont également montré que le domaine RoXaN LD seul agit comme un signal

d'export nucléaire et que le complexe RoXaN-PAPB agit comme un signal d'export d'ARN⁶¹.

I.1.4.1.4. NSP4, un récepteur pour la particule virale

La glycoprotéine NSP4 est produite par le segment 10 sous forme d'un précurseur de poids moléculaire estimé à 20 KDa, qui devient mature après sa glycosylation au niveau des arginines 8 et 18. Cette protéine possède trois domaines hydrophobes N-terminaux et une séquence signal qui assure son ancrage dans la membrane du réticulum endoplasmique⁶⁴, tandis que, le domaine C-terminal hydrophile est cytoplasmique. De plus, trois sites de fixation au calcium ont également été identifiés, deux d'entre eux sont localisés dans la partie C-terminale et le troisième est situé dans la partie N-terminale.

La protéine NSP4 est aussi, caractérisée par ses propriétés d'oligomérisation en absence de toute autre protéine, conduisant ainsi à la formation de tétramères. Cette propriété a été mise en évidence par transfection du gène 10 et son expression suivie de pontages chimique^{65,66}. D'autre part, NSP4 en interaction avec la protéine VP6 agit comme un récepteur aux particules infectieuses à double couche (DLP) lors de la morphogénèse virale, assurant ainsi leur translocation à travers la membrane du réticulum endoplasmique⁶⁷⁻⁶⁹. La protéine NSP4 liée à l'enveloppe transitoire formée par le bourgeonnement de la particule immature à travers la membrane du réticulum endoplasmique sont exclues de la particule mature, après assemblage de la capside externe, VP4 et VP7, sur la DLP⁷⁰. Au cours de ce processus, il a été suggéré que le domaine N-terminal de NSP4 interagissait avec la glycoprotéine VP7, tandis que VP4 interagissait avec la région C-terminale de NSP4⁶⁵. Poruchynsky et al., ont montré que la déplétion en calcium du réticulum endoplasmique induit une dissociation de l'hétéro complexe NSP4/VP4/VP7, conduisant à une accumulation des particules virales immatures enveloppées⁷¹. En plus, de par son implication dans la maturation des particules virales, la protéine NSP4 intervient également dans la distribution des protéines structurales et non structurales, dans la maturation des viroplasmes et dans la régulation de la synthèse des ARNm⁷²⁻⁷⁴.

Une autre fonction, l'activité entérotoxique, a été également attribuée à la protéine NSP4. En effet, Dong et al., ont montré que la protéine NSP4 induit une perturbation des membranes plasmiques, qui entraîne un influx du calcium extracellulaire dans les cellules, par activation du récepteur à la phospholipase C et la production d'inositol trisphosphate (IP₃)⁷⁵.

I.1.4.1.5. NSP5, une protéine kinase

La protéine NSP5 est codée par le segment biscistronique 11 et détectée dans les viroplasmies. Cette autokinase existe sous différents états de phosphorylation^{51,76-79}, qui pourraient être à l'origine du processus de sélection des ARN viraux, conduisant à l'encapsidation des ARN génomiques dans les particules virales. D'autre part, Le rôle de la phosphoprotéine O-glycosylée dans le cycle viral a été mis en évidence par l'utilisation des siRNA. En effet, l'inhibition de l'expression de la protéine NSP5 induit une chute de la synthèse des ARN viraux simples et doubles brins^{80,81}.

Un autre rôle a été également associé à la protéine NSP5. Il s'agit d'une activité ATPase spécifique, magnésium (Mg^{2+}) dépendante. Cette activité a été corrélée à un faible niveau de phosphorylation de la protéine NSP5, suggérant ainsi un lien possible entre l'hydrolyse d'ATP et l'activité autokinase⁸².

I.1.4.1.6. NSP6, protéine d'interaction avec les acides nucléiques

NSP6 est la protéine localisée dans les viroplasmies⁸³ et codée par la deuxième phase de lecture du segment 11. Les expériences de double-hybride effectuées par Gonzalez et al., montrent que la protéine NSP6 semble interagir avec la protéine NSP5⁴³. De plus, il s'avère que NSP6 est une protéine de liaison aux acides nucléiques, séquence indépendante, avec des affinités similaires pour les ARN simple brin et double brin⁸⁴.

I.1.4.2 Les protéines structurales

I.1.4.2.1. VP1, l'ARN polymérase

La protéine VP1, présente sous forme de 12 molécules par virion, est codée par le segment 1^{85,86}. L'existence de quatre motifs communs aux séquences d'ARN polymérase, laisse penser que la protéine VP1 dispose d'une fonction ARN-polymérase⁸⁶. En effet l'interaction covalente de VP1 avec un analogue structural de nucléotide photoactivable, induit l'inhibition de cette activité⁸⁷. De plus, Gombold et Ramig ont montré que les mutants thermosensibles du gène 1 sont incapables d'exprimer l'ARN simple ou double brin⁸⁸. D'autre part, Chen et Patton ont montré que l'extrémité 3' de l'ARNm viral doit être sous forme d'un simple brin pour initier la synthèse du brin complémentaire et que l'interaction de VP1 avec l'ARN n'est pas suffisante pour la synthèse de ce brin (-)⁸⁹.

I.1.4.2.2. VP2, la protéine de structure

La protéine VP2 est exprimée à partir du segment 2. Elle est la composante majoritaire du core formé par l'association de 60 dimères de VP2 (VP2A et VP2B) organisés selon une symétrie icosaédrique $T=1$. Les propriétés hydrophiles du domaine N-terminal⁹⁰ de la protéine VP2 assurent la liaison des ARN⁹¹, des protéines VP3 et des protéines VP1³¹, qui sont encapsulées au sein de cette couche interne^{26,30,32}. Douze copies de VP1 et VP3 sont incorporées sous forme d'hétérodimères, ancrés à la surface intérieure de la couche de VP2, entourées par le génome (ARN) partiellement ordonné et répartis au niveau des sommets des 12 canaux de type I^{26,32} formés par un pentamère de VP2A (Figure I.1.4.2.2.1. A). Ces canaux relativement petits sont bordés de résidus hautement conservés, chargés positivement (K526, R527 et R531), ils comportent également des boucles flexibles qui forment une barrière interne et qui sont nécessaires pour le passage de l'ARNm néo-transcrit³⁸ (Figure I.1.4.2.2.1. B).

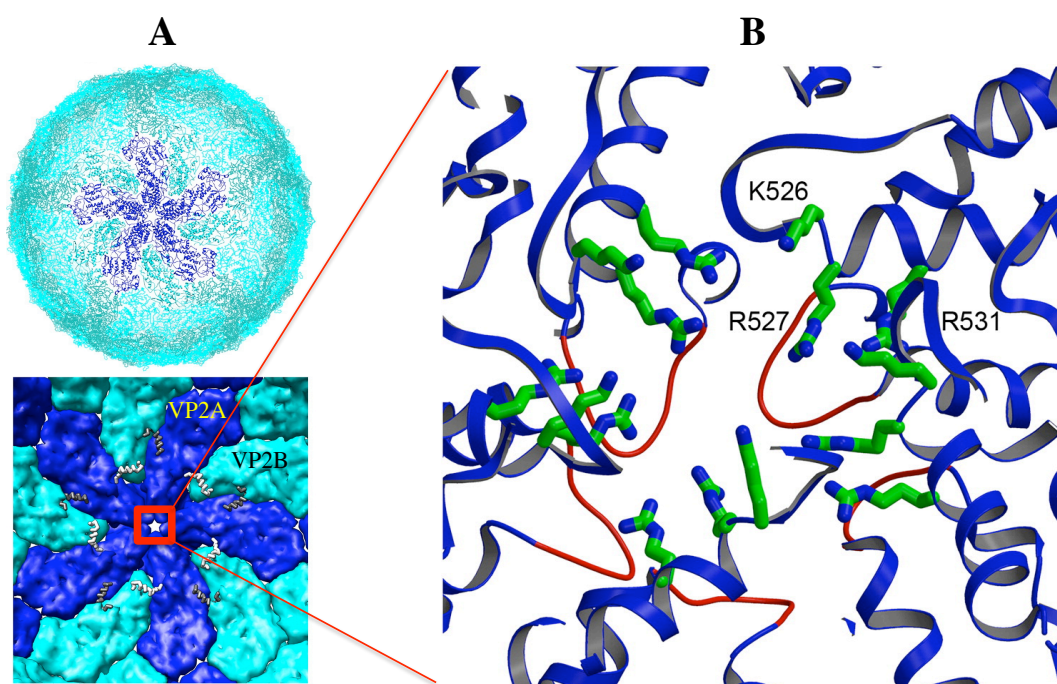


Figure I.1.4.2.2.1 : Structure de la protéine du core (VP2) déterminée par cristallographie avec une résolution de 3.8 Å (d'après McClain et al, 2010).

A. Vue de l'extérieur (en haut) et de l'intérieur (en bas) de la capsid selon l'axe d'ordre 5. Le décimère central est mis en évidence avec la représentation de VP2A en bleu foncé et de VP2B en bleu clair.

B. Représentation du canal d'ordre I (localisé sur les axes icosaédriques d'ordre 5) formé par l'association des 5 sous-unités de VP2A. Les principaux résidus conservés chargés positivement sont indiqués en bâton et les boucles (354-363) qui forment une barrière interne sont représentées en rouge.

De plus, il est important de préciser que la partie N-terminale de VP2, essentielle pour l'encapsidation du complexe VP3/VP1 et du génome, n'est pas requise pour la formation des pseudo-particules virales. En effet, la délétion des 92 premiers résidus de VP2 entraîne la perte de leur capacité à lier VP3 et VP1, tandis que, leurs propriétés d'auto-assemblage et l'interaction avec VP6 restent inchangées³¹.

L'association de la protéine VP6, selon une triangulation T=13, sur la couche interne de VP2 par le biais des interactions impliquant deux hélices α de VP2 et la boucle $\beta 2$ - $\alpha 3$ de VP6 (résidus 64 à 72), conduit à la formation de particules virales infectieuses à deux couches protéiques appelées DLP. D'après le modèle proposé par McClain et al., le segment étendu ($\beta 2$ - $\alpha 3$) de la chaîne polypeptidique VP6 qui longe les deux hélices α de VP2, parvient à s'adapter aux 13 emplacements distincts de VP2 qui lui fait face. Ainsi, les chaînes latérales des résidus T69 et L71 situées sur la boucles $\beta 2$ - $\alpha 3$ de VP6, forment des contacts hydrophobes avec les résidus hydrophobes portés par les deux hélices α de VP2³⁸, tels que décrit dans la partie I.4.2.5.

I.1.4.2.3. VP3, la guanyltransférase

VP3 est une protéine du core viral, codée par le segment 3. Une activité guanyltransférase a été associée à cette protéine^{92,93}, qui lui permet d'ajouter une coiffe en 5' des ARNm. De plus Chen et al, ont montré que VP3 possède une activité méthyltransférase, induisant ainsi la méthylation des ARN exogènes⁹⁴. D'autre part les travaux de Patton et al., ont révélé une affinité de VP3 uniquement pour les ARN simple brin sans spécificité de séquence⁹⁵.

I.1.4.2.4. VP4, la protéine de spicules

La protéine de la capside externe VP4 est codée par le segment 4. Cette protéine sensible aux protéases constitue les 60 spicules ancrés au niveau des canaux de type II, qui jaillissent d'au moins de 120 Å à partir de la surface de la capside. Chaque spicule constitué de trois molécules de VP4, adopte un dimère apparent en présence de trypsine tel qu'il a été proposé par Dormitzer et al^{36,37}, en se basant sur les études de marquage par les fragments Fab spécifique de VP4^{96,97}. De plus, l'équipe de Prasad et de Dormitzer suggèrent que VP4 subit une série de réarrangements structuraux uniques à partir d'un état désordonné, avant clivage par la trypsine, vers une forme trimérique requise pour l'entrée du virus, en passant par le dimère apparent issu de la maturation par la trypsine^{36,98-100} (Figure I.1.4.2.4.1).

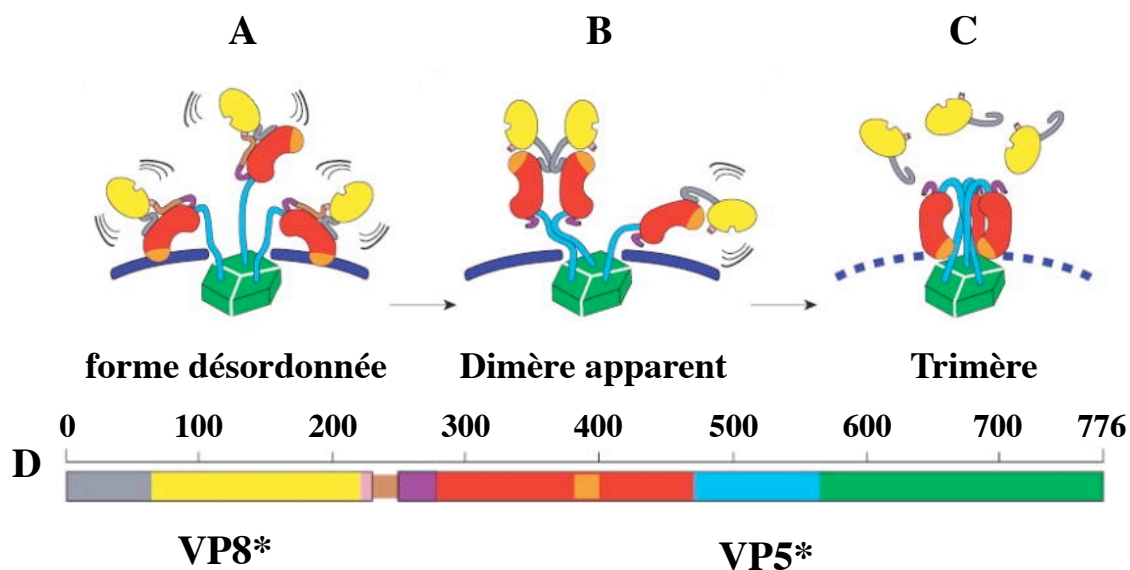


Figure I.1.4.2.4.1 : Représentation schématique des réarrangements structuraux de VP4 avant et au cours de l'entrée du virus (d'après Dormitzer et al., 2004).

Les couleurs utilisées pour les schémas (A-B) correspondent aux différents segments de VP4 indiqués dans la séquence linéaire (D). VP7 est représenté par les traits bleus continus, avant la dissociation de la capside externe, tandis que les traits bleus discontinus correspondent aux trimères de VP7 dissociés.

A. Forme désordonnée des spicules de VP4 en l'absence de trypsine.

B. Dimères apparents de VP4 issus du réarrangement des trimères après maturation par la trypsine, qui induit l'excision des résidus 232-247 (marron) et l'apparition des deux fragments tryptiques, VP8* (jaune) et VP5* (en bleu, vert et rouge).

C. Forme trimérique de VP5* requise pour l'interaction avec les membranes

Au cours de l'infection, pendant la protéolyse, les molécules de VP4 sont clivées dans le tube digestif, un environnement riche en protéases, en VP8* (1 à 231) et VP5* (247 à 776) et les produits de clivage restent associés dans le virion. Il en résulte ainsi une excision des résidus 232 à 247 suivie de changements conformationnels tels qu'illustrés précédemment^{101,102}, induisant une amélioration de l'infectivité virale et facilitant l'entrée du virus dans les cellules¹⁰¹⁻¹⁰³.

L'entrée du virus impliquant la protéine VP4, s'effectue en plusieurs étapes. Ce processus est initié par l'interaction du domaine globulaire VP8* avec l'acide sialique^{35,104,105} (Figure I.1.4.2.4.2. A), il en résulte ainsi des changements conformationnels induisant le détachement de VP8* du squelette de VP5*, tandis que son domaine N-terminal reste attaché à la base du trimère de VP5*³⁷, tel que proposé par Settembre et al³⁷. VP5* peut ainsi exposer

ses boucles hydrophobes vers la membrane et interagir à son tour avec les intégrines $\alpha 2\beta 1$ grâce au tripeptide 308-DGE-310 (Figure I.1.4.2.4.2. B) et également avec la protéine Hsc 70 par le biais du domaine 642-659.

Il est important à noter que l'hémagglutinine virale VP8* est une cible importante des anticorps neutralisant et que les modes de neutralisation, telle l'inhibition du désassemblage de la couche externe¹⁰⁶, sont multiples. D'autre part, l'interaction de la protéine VP4 avec les protéines Rab5 et PRA1 a été démontrée par des expériences de double hybride¹⁰⁷. De plus, Delmas et al., ont suggéré que ces interactions pourraient intervenir dans le trafic cellulaire de VP4 et dans l'assemblage final des particules virales matures¹⁰⁸.

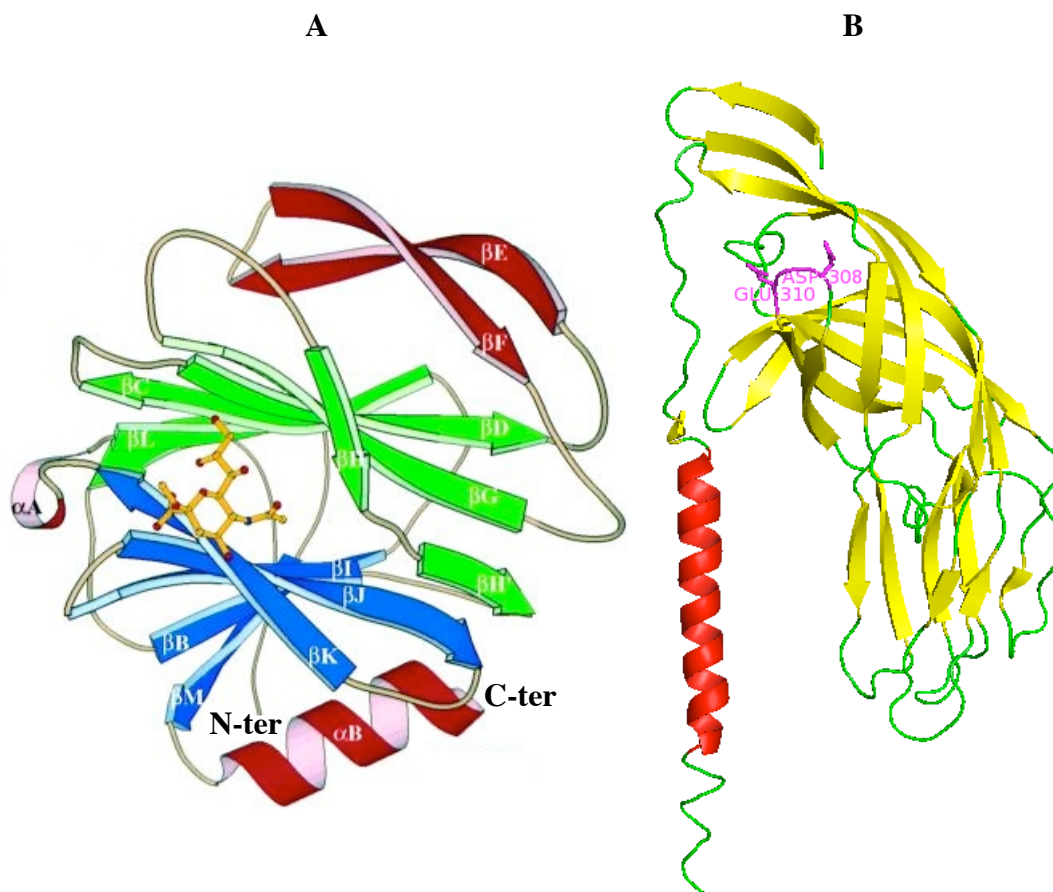
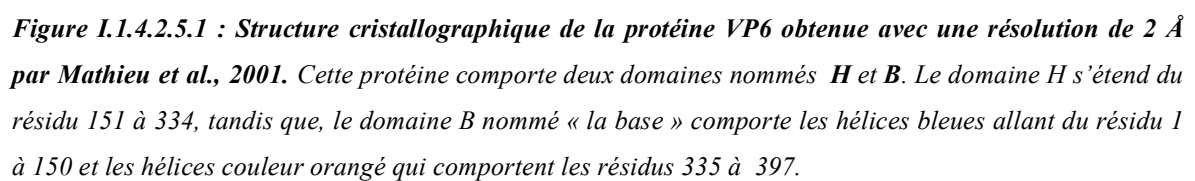


Figure I.1.4.2.4.2 : Structure cristallographique du domaine globulaire VP8* lié à l'acide sialique (A) et du dipeptide N252-L523 de VP5* (VP5CT) (B), d'après Dormitzer et al., 2002 et 2004.

Le tripeptide localisé sur une boucle, permettant au domaine VP5* de se lier aux intégrines $\alpha 2\beta 1$ est indiqué en magenta

La protéine VP6 représente plus de la moitié (51%) de la masse totale des particules virales. Codée par le segment 6, cette protéine est constituée par un domaine B et un domaine H^{34,109} (Figure I.1.4.2.5.1).



Le domaine B nommé « la base » comporte les résidus allant de 1 à 150 et de 335 à 397 organisés principalement en hélices α . Il permet non seulement d'établir des interactions entre les trimères mais assure également les interactions avec la protéine VP2, par le biais des boucles $\beta 2-\alpha 3$ contenant les résidus G64 à N72^{32,38,110} (Figure I.1.4.2.5.2). En effet Charpilienne et al., ont montré que la mutation d'un ou de plusieurs acides aminés portés par cette boucle, avait pour conséquence soit l'inhibition de l'activité transcriptionnelle, soit la perte de la capacité d'assemblage de VP6 sur le core, ou bien les deux¹¹⁰. D'autre part, McClain et al., ont montré que les boucles $\beta 2-\alpha 3$ qui longent deux hélices α de VP2, parviennent à s'adapter aux 13 emplacements distincts de VP2 qui leur font face, de sorte que les chaînes latérales de T69 et L71, situées sur la boucle $\beta 2-\alpha 3$, puissent former des contacts hydrophobes avec les résidus apolaires portés par les deux hélices α de VP2. Selon le modèle de McClain, les contacts les plus importants font intervenir les chaînes latérales de T69 et L71 de **VP6-T**, trimère de VP6 traversé par un axe d'ordre 3 (Figure I.1.4.2.5.2. A et B) et les résidus M228, M839, M841, F224 et A220 de VP2B formant une poche hydrophobe (Figure I.1.4.2.5.2. C).

Il est important à noter, que la poche équivalente sur la surface des sous unités VP2A abrite les chaînes latérales des résidus L70 et L71 (situés sur les boucles $\beta 2-\alpha 3$) appartenant à l'une des trois sous unités de **VP6-D** (Figure I.1.4.2.5.2. A). De plus, deux sous unités du trimère de **VP6-P'**, sous unité de VP6 adjacente aux axes d'ordre 5 (Figure I.1.4.2.5.2. A), possèdent des surfaces d'interaction avec VP2B très étendues, incluant un réseau de liaisons hydrogènes mais également des interactions de types Van der Waals. Par contre, la boucle $\beta 2-\alpha 3$ de la troisième sous unité de **VP6-P'** n'établit aucun contact avec VP2. Les différentes sous-unités de VP6 (VP6-T, VP6-D, VP6-P') sont définies dans la Figure I.1.4.2.5.2. ci-dessous.

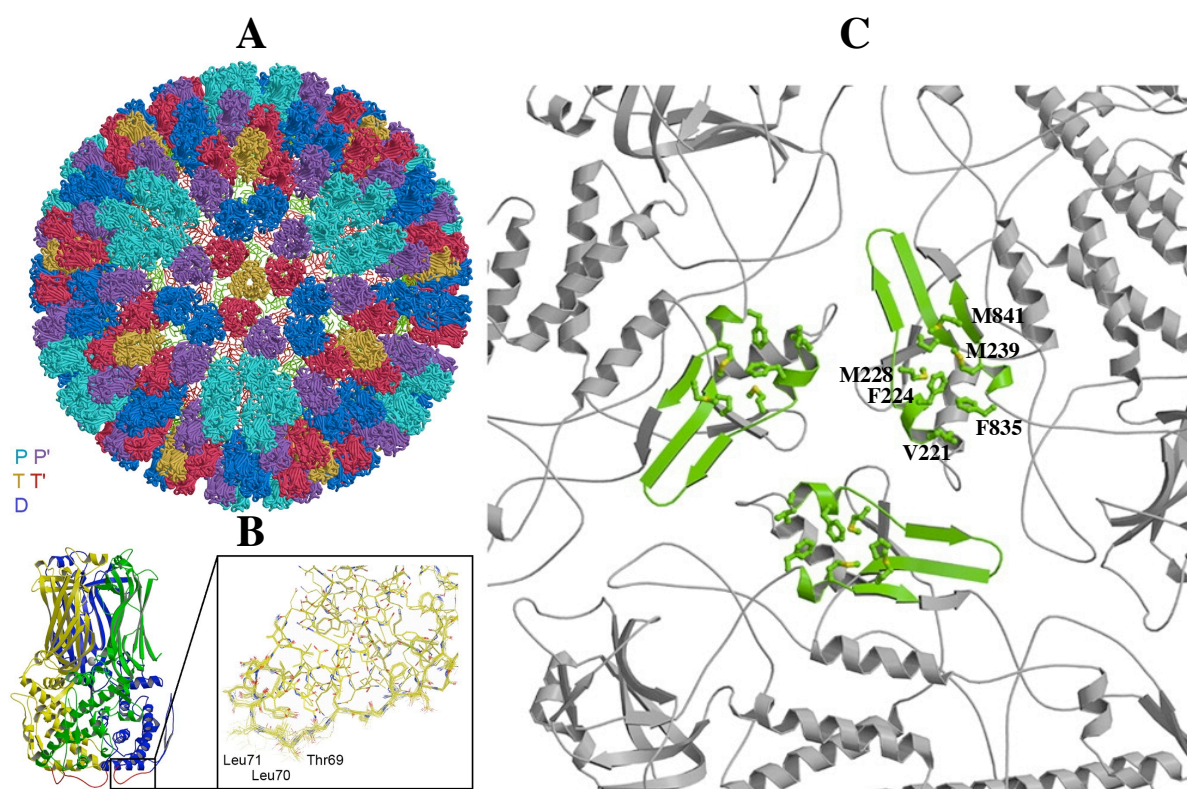


Figure I.1.4.2.5.2 : Représentation schématique de l'organisation de la protéine VP6 et mise en évidence des résidus impliqués dans l'interaction de VP6 avec VP2 (d'après McClain et al., 2010).

A. Schéma représentatif de l'organisation des 260 trimères de VP6 qui forment la capsid. Les trimères sont colorés en fonction de leur localisation par rapport aux différents axes de symétrie icosaédrique, de couleur or (VP6-T : axe d'ordre 3), rouge (VP6-T' : adjacent à l'axe d'ordre 3), bleu foncé (VP6-D : le plus proche de l'axe d'ordre 2), bleu clair (VP6-P : entourant l'axe d'ordre 5) et en violet (VP6-P' : adjacent aux axes d'ordre 5).

B. Vue de la boucle $\beta 2$ - $\alpha 3$ dans la conformation idéale pour interagir avec la poche hydrophobe de VP2 représentée sur la partie C de la Figure.

C. Vue le long de l'axe d'ordre 3 mettant en évidence les résidus (en vert) impliqués dans l'interaction avec VP6.

Le domaine H (nommé « tête »), composé majoritairement de feuillets β , constitue le sommet de la protéine. Ce dernier intervient dans la formation et la stabilisation des trimères de VP6 par le biais d'interactions hydrophobes³⁴. D'autre part, il permet également l'interaction avec les protéines VP7 et VP4 par l'intermédiaire de boucles exposées dans la partie haute. En effet, Li et al., ont pu identifier deux régions distinctes impliquées dans l'assemblage de la protéine VP7 sur la capsid intermédiaire VP6³² (Figure I.1.4.2.5.3. A et B). Le premier site d'interaction fait intervenir l'hélice H4 (W289 à V309) de VP7 et les

boucles D'D'', H α A de la protéine VP6. Ces deux boucles comportent respectivement les résidus S240 à T245 et L294 à M300 (indiquées en cyan, Figure I.1.4.2.5.3. A). Alors que le second site nécessite l'interaction entre la petite hélice P302-F308 de VP6 (indiquée en violet, Figure I.1.4.2.5.3. B) et les deux hélices H1 et H2 de VP7.

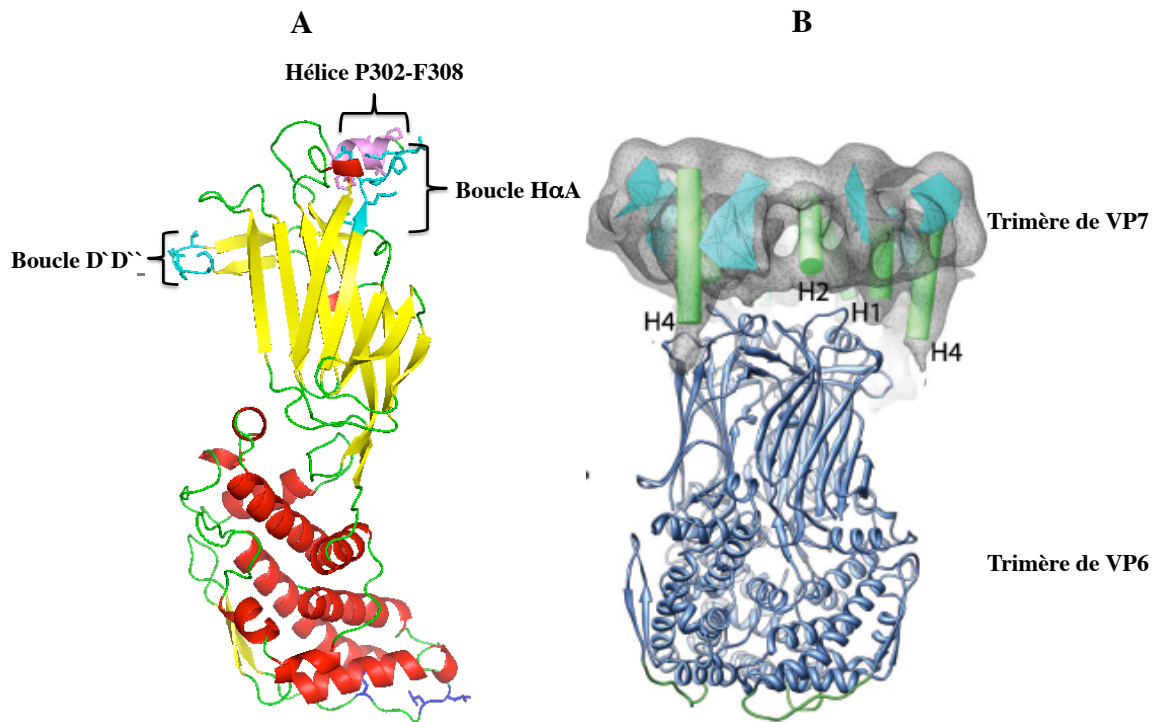


Figure I.1.4.2.5.3 : Représentation des différentes régions impliquées dans l'interaction de la protéine VP6 avec la protéine VP7.

A. structure cristallographique de la protéine VP6 (Mathieu et al., 2001). Les deux boucles « D'D'' » et « H α A » impliquées dans la liaison avec les hélices H4 de VP7 sont représentées en cyan, tandis que l'hélice α (P302-F308) permettant l'interaction avec les hélices H1 et H2 de VP7 est colorée en violet.

B. Représentation du complexe VP6-VP7 indiquant les différentes hélices de VP7 impliquées dans la liaison à VP6 en vert (D'après Li et al., 2009).

I.1.4.2.6. VP7, la glycoprotéine externe

La glycoprotéine majeure de la capside externe, VP7, est codée par le segment 9. Glycosylée en position 69¹¹¹, pendant sa traduction, au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE), cette protéine n'est pas exportée vers l'appareil de Golgi^{111,112}. L'insertion et la rétention de protéine membranaire intégrale VP7 dans la membrane du RE se fait par le biais d'une séquence signale¹¹³ (Figure I.1.4.2.6.1. A), clivée par la suite au niveau du site de clivage, localisé entre A50 et Q51^{64,114,115}. Les études effectuées par Mass et Atkinson, révèlent la présence d'un segment consensus composé par les résidus LPITG du N-terminal vers le C-terminal, responsable de la rétention de VP7 dans le réticulum endoplasmique. D'autre part, l'analyse de mutants de VP7 indique que seuls les résidus ITG sont importants¹¹⁶. En plus de la séquence signal, la protéine VP7 contient trois régions majeures antigéniques nommées A, B et C^{117,118}, qui comportent respectivement les résidus 86 à 101, 142 à 152 et 208 à 221. VP7 comporte également trois motifs tripeptidiques de liaison aux intégrines : CNP, LDV et GPR. La séquence CNP qui s'étend du résidu 165 à 167, permet l'interaction avec le récepteur $\alpha v \beta 3$, tandis que, le fragment LDV en position 237-239 assure la liaison au récepteur $\alpha 4 \beta 1$. Enfin, le tripeptide GPR (253-255) interagit avec l'intégrine $\alpha x \beta 2$ ¹⁰⁴ (Figure I.1.4.2.6.1. A et B). Il est important à noter, que l'interaction de VP7 avec les différents récepteurs intégrines est une étape importante pour l'entrée du virus dans la cellule hôte¹⁰⁴.

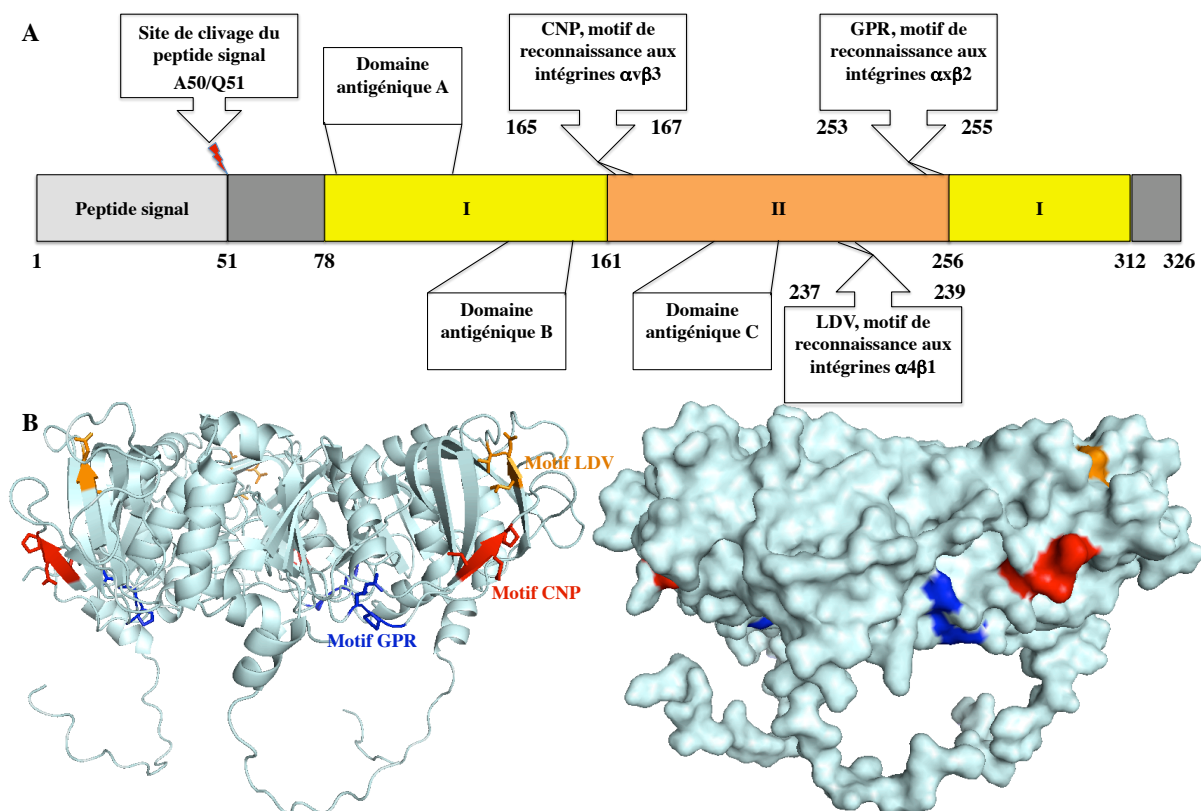


Figure I.1.4.2.6.1 : Représentation schématique, structurale et antigénique de la glycoprotéine VP7.

Après le clivage du peptide signal au niveau des résidus A50/Q51, l'extrémité N-terminale de VP7 est bloquée par l'acide pyroglutamique au sein de la particule virale. Le domaine I, adopte une structure de type « Rossmann fold ». Le domaine II est organisé en « Beta barrel ». B. Représentation en cartoon (à gauche) et en surface (à droite) de la structure cristallographique du trimère de VP7, indiquant la localisation des motifs d'interaction avec les intégrines. Le motif GPR est indiqué en bleu, le motif CNP est représenté en rouge et le motif LDV est désigné en orange.

L'association de 260 trimères de VP7 stabilisés par les ions calcium (Figure I.1.4.2.6.2. A), selon une triangulation $T=13$ sur la couche intermédiaire de VP6, par le biais des interactions décrites dans le paragraphe I.1.4.2.5, Figure I.1.4.2.5.3. B, conduit à la formation de particules virales à trois couches protéiques. La structure de VP7, dans une conformation fixant le fragment Fab d'un anticorps monoclonal neutralisant, a été rapportée par Aoki et al. Cette structure cristallographique obtenue avec une résolution de 3.4 Å révèle la présence de deux motifs structuraux distincts, l'un est un « Rossmann fold » et l'autre est un « Beta-barrel » (Figure I.1.4.2.6.2. B)³³. De plus, les éléments de structures secondaires qui constituent ces deux motifs, ont été observés préalablement par cryo-EM³² par Li et al.,

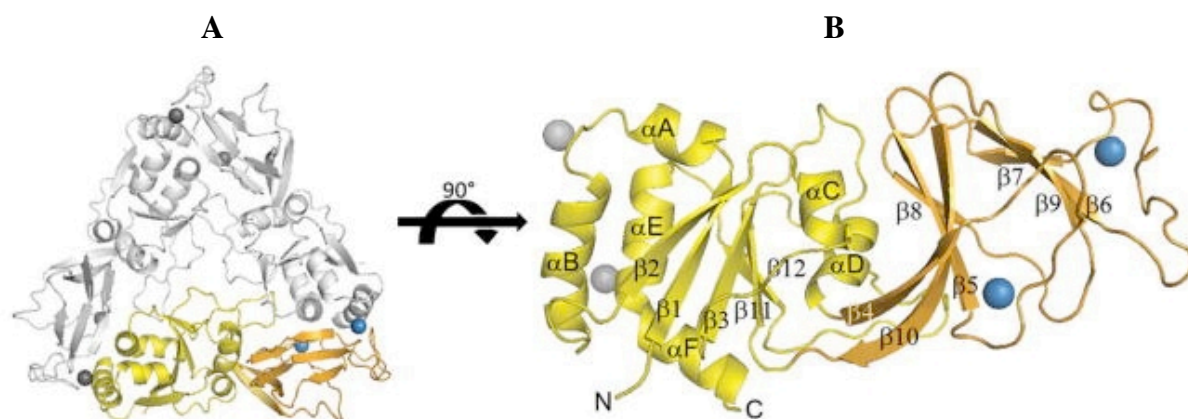


Figure I.1.4.2.6.2 : Structure cristallographique de la glycoprotéine VP7 obtenue à une résolution de 3.4 Å, dans une configuration liant un fragment Fab d'anticorps monoclonal neutralisant (D'après Aoki et al., 2009).

A. Vue le long de l'axe d'ordre 3 du trimère de VP7 stabilisé par les ions calcium (en bleu et gris).

B. Vue de côté d'une seule sous unité de VP7. Les deux motifs structuraux distincts sont indiqués par des couleurs différentes, en jaune le « Rossmann fold » et en orange le « Beta-barrel »

Dans le cas de la glycoprotéine VP7, les ions calcium semblent avoir un rôle important dans la stabilisation de la capside externe^{119,120}. En effet la présence d'agent chélatants, tels que l'EDTA ou l'EGTA, ou la baisse de la concentration en calcium en deçà d'une concentration seuil, induit la dissociation de la capside externe, libérant ainsi les particules virales infectieuses (DLPs) transcriptionnellement actives¹²¹. Les travaux de Ruiz et al., indiquent que la concentration critique en calcium varie en fonctions de la souche virale, elle est de 20 nM pour le rotavirus simien et de l'ordre de 900 nM pour la souche bovine¹²². D'autre part il est important à noter que la protéine VP7 est altérée, lorsque le milieu de culture est dépourvu de calcium¹²³. Ceci est probablement dû aux modifications conformationnelles constatées par Dormitzer et al¹²⁴.

L'assemblage de la capside externe ou la présence d'anticorps non neutralisants spécifiques de la protéine VP6 à la surface des DLPs, conduit à une inhibition de la transcription. L'analyse et la comparaison des reconstructions tridimensionnelles des particules de type TLPs et DLPs liées aux segments Fab non-inhibiteurs ou inhibiteurs (Fab spécifique de VP6) caractérisés par Ginn et al.¹²⁵, révèlent une inhibition de la transcription

liée uniquement à la présence de VP7 et au Fab inhibiteur^{126,127}. En effet, la reconstruction des TLPs indique que la présence de VP7 induit un rétrécissement du canal de type I, localisé au niveau des axes d'ordre 5, d'où surgit l'ARNm néo-synthétisé. Lawton et al., proposent que le rétrécissement du canal de type I, soit associé à un changement conformationnel au niveau de la base de la protéine VP6 (Figure I.1.4.2.6.3)¹²⁶. D'autre part, Thouvenin et al., suggèrent un autre processus d'inhibition selon lequel le rétrécissement des canaux de type I serait dû aux changements conformationnels au niveau des liaisons entre VP2 et VP6, limité autour des axes d'ordre 5¹²⁷.

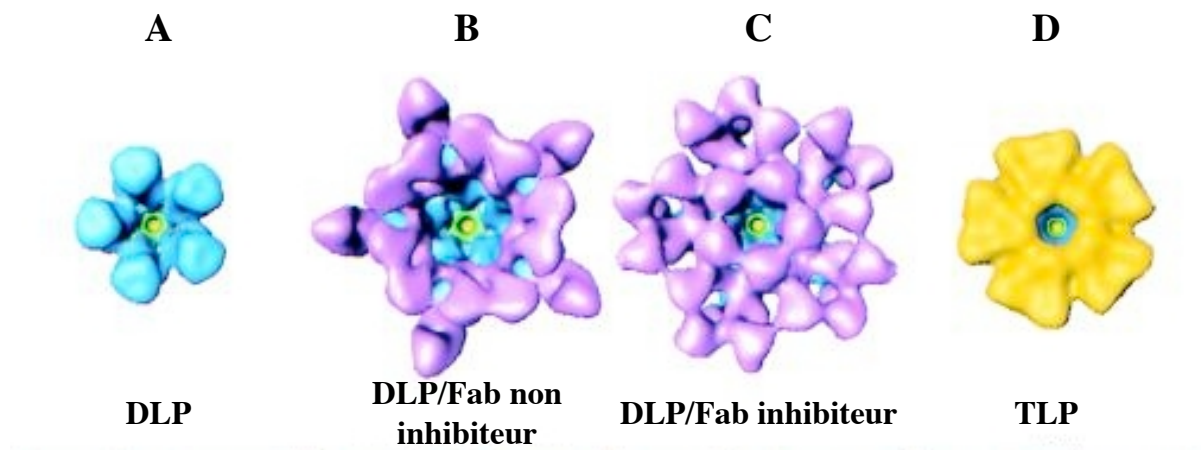


Figure I.1.4.2.6.3 : Etude structurale comparative mettant en évidence le rétrécissement du canal de type I, réalisé par Lawton et al., 1999.

A à D : Comparaison de l'architecture du canal de sortie des ARNm dans les DLP, DLP/Fab non-inhibiteur, DLP/Fab inhibiteur et TLP illustrant le rétrécissement de ce canal localisé au niveau de l'axe d'ordre 5. Les trimères de VP6 sont indiqués en bleu, les Fabs en violet et VP7 en jaune.

En plus de l'implication de la glycoprotéine VP7 dans la maturation des particules virales, dans l'inhibition de la transcription et dans l'entrée du virus dans la cellule hôte, Charpilienne et al., ont montré que des fragments tryptiques de VP7 induisaient la déstabilisation des membranes liposomales¹²⁸. Leurs travaux indiquent que des pseudo-particules virales VLP2/6/7, traitées par la trypsine en présence d'agent chélatant du calcium « EGTA », induisent la perméabilisation des vésicules multilamellaires (MLVs) contenant de la 6-CF, alors que les pseudo-particules virales VLP2/6, ayant subi le même traitement, n'ont aucun effet sur les membranes (Figure I.1.4.2.6.4).

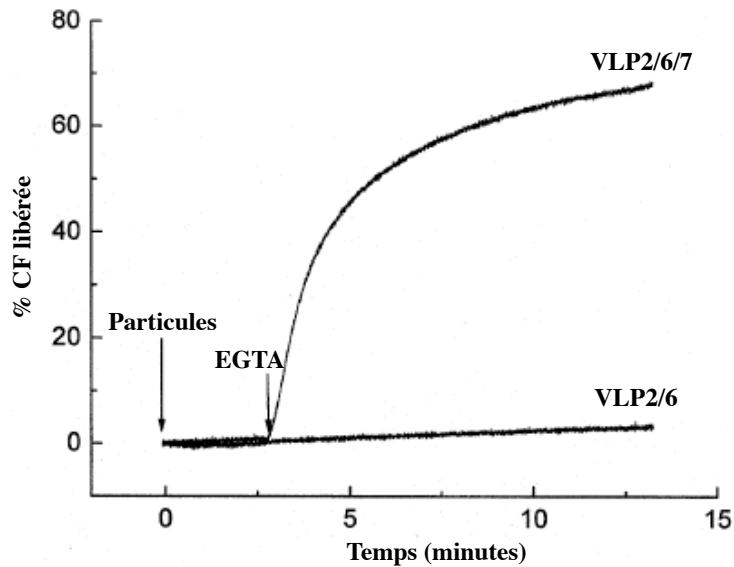


Figure I.1.4.2.6.4 : Cinétique de libération de la 6-CF induite par des pseudo-particules virales VLP2/6/7, traitées par la trypsine en présence d'EGTA. (D'après Charpilienne et al. 1997).

Ils ont suggéré une entrée du rotavirus par un mécanisme d'endocytose impliquant les fragments tryptiques de VP7. Ces fragments interviennent dans la perméabilisation des endosomes, permettant ainsi la libération des particules virales infectieuses dans le cytoplasme.

Il est important à mentionner que l'analyse des particules virales par HPLC et spectroscopie de masse suivie d'un séquençage d'Edman, montre que les particules virales contiennent des molécules de trypsine¹²⁹. Bénureau et al. suggèrent que la trypsine est inactive lorsqu'elle est associée aux particules virales à triple couche protéique (TLPs) et est donc inaccessible aux inhibiteurs de protéase. De plus, ils indiquent que l'activation de la trypsine dépend de la solubilisation de la couche externe.

I.1.5. Cycle viral

Le rotavirus infecte préférentiellement les entérocytes matures localisés au niveau du sommet des villosités de l'intestin grêle. Le cycle viral (Figure I.1.5.1) est initié par la fixation des TLPs, particules à triple couche protéique, à la surface cellulaire par interaction du domaine VP8* aux Sialo-glycanes¹³⁰, ou par interaction aux HBGAs¹⁰⁵ (histo-blood group antigen A-types), à l'aide d'un glycanes comportant un acide sialique. Il en résulte ainsi un léger changement conformationnel de la protéine VP4 (VP8* + VP5*). Cette première étape

est suivie d'une série d'interactions avec les récepteurs cellulaires qui se déroule de manière séquentielle, impliquant respectivement les protéines VP5* et VP7. La protéine VP5* assure la liaison au récepteur intégrine $\alpha 2\beta 1$ et à la protéine Hsc 70 (Heat shock protein)¹³¹, tandis que la protéine VP7 interagit avec les récepteurs $\alpha \nu \beta 3$ et $\alpha x \beta 2$. L'entrée du virus dans la cellule semble être un mécanisme qui se déroule en plusieurs étapes et reste toujours sujet à débat. Deux mécanismes ont été suggérés : une entrée directe du virus à travers la membrane plasmique¹⁰³ ou bien une internalisation par endocytose¹³². Dans les deux cas, la dissociation de la couche externe constituée des protéines VP7 et VP4 est requise, cette étape est suivie d'une déstabilisation de la membrane plasmique ou de celle des endosomes induite par la protéine VP5* et les fragments tryptiques de VP7 (objet de cette thèse). Cette déstabilisation membranaire est essentielle pour la translocation de la particule virale transcriptionnellement active (DLP) vers le cytoplasme, siège de la réplication.

L'ARN polymérase (VP1) est alors activée suite à la décapsidation, il en résulte ainsi la transcription de manière simultanée des 11 gènes par les 12 complexes enzymatiques hétérodimériques constitués de VP1/VP3. Les ARNm néosynthétisés vont dans un premier temps servir pour la synthèse des protéines virales, puis dans un second temps, être utilisés pour la réplication et l'encapsidation, au sein des viroplasmes, du génome dans les DLPs produites.

Les particules virales immatures (DLP) bourgeonnent au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique après fixation de leurs récepteurs intracytoplasmiques (NSP4) et acquièrent ainsi une membrane transitoire avant l'étape finale d'assemblage. La perte de la membrane transitoire et l'assemblage de la capsid externe (VP7 + VP4) résultent dans la maturation des TLPs, libérées par lyse cellulaire.

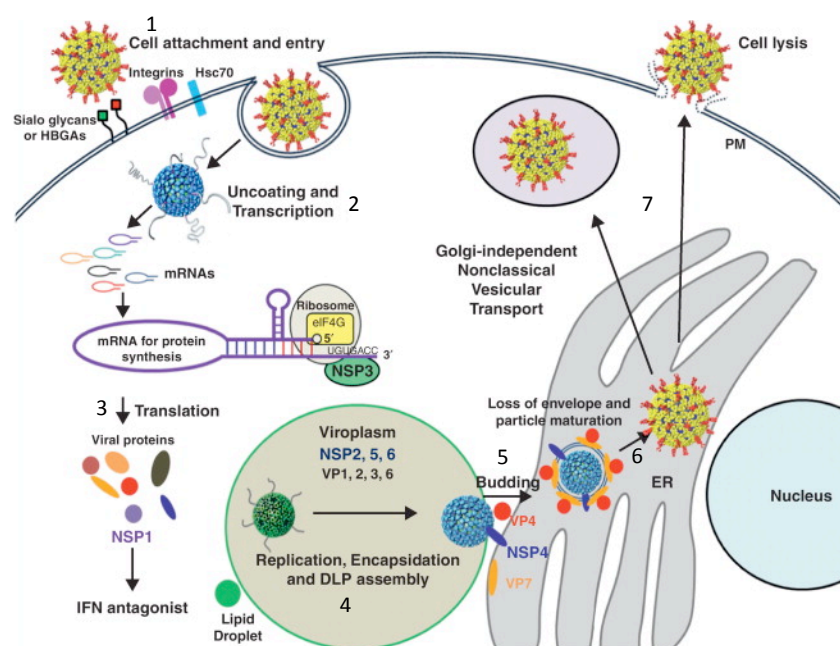


Figure 1.1.5.1 : Représentation schématique du cycle de réplication du rotavirus (d'après Li et al., 2012).

1. Attachement et entrée du virus ; 2. Décapsidation et transcription des ARN viraux ; 3. Traduction des ARNm ; 4. Réplication du génome viral et assemblage des DLPs ; 5. Translocation des DLPs dans le réticulum endoplasmique ; 6. Acquisition de la capsid externe ; 7. Relargage des particules virales matures (TLPs)

I.1.6. Entrée du virus

Contrairement aux virus enveloppés, les mécanismes qui permettent l'internalisation des virus non enveloppés en général et du rotavirus en particulier sont encore mal compris. Cependant une description générale du processus de transport de la particule virale vers l'intérieur de la cellule a été proposée. Ce mécanisme s'effectuant en plusieurs étapes comprend : le clivage par la trypsine de la protéine VP4 en VP8* et VP5* ; l'attachement cellulaire et enfin l'internalisation des DLPs, particules virales infectieuses, dans le cytoplasme après déstabilisation de la membrane (plasmique ou endosomale). La solubilisation de la capsid externe peut s'effectuer selon deux mécanismes toujours débattus : une entrée directe du virus à travers la membrane plasmique¹⁰³ ou bien une internalisation par endocytose¹³² puis entrée à travers la membrane de l'endosome.

I.1.6.1 Clivage de la protéine VP4 en VP8* et VP5*

La protéolyse au niveau du tube digestif de la protéine VP4, au cours de l'infection est une étape cruciale pour l'entrée du virus. Le clivage de VP4 en VP8* (1-231) et VP5* (247-

776) qui restent associées dans le virion, induit une excision des résidus 232 à 247 suivie de changements conformationnels, entraînant une amélioration de l'infectivité virale et facilitant l'entrée du virus dans les cellules^{101,102,131}.

I.1.6.2 L'attachement cellulaire

Plusieurs éléments laissent à penser que les rotavirus interagissent séquentiellement avec plusieurs récepteurs cellulaires impliquant les protéines VP4 et VP7 de la couche externe, permettant ainsi l'entrée du virus dans la cellule¹³³⁻¹³⁹. L'ensemble des travaux effectués afin de déterminer les différentes étapes conduisant à la translocation du virus dans le cytoplasme, suggèrent que le premier contact du virus avec la surface cellulaire s'effectue par interaction de la protéine VP8* avec les récepteurs cellulaires contenant l'acide sialique. Après ce premier contact avec l'acide sialique, le virus interagit avec quatre autres protéines à la surface cellulaire : $\alpha 1\beta 2$, Hsc 70, $\alpha v\beta 3$ et $\alpha x\beta 2$ (Figure I.1.6.2.1)

I.1.6.2.1. Interaction de VP8* avec l'acide sialique

Les souches de rotavirus NA-sensibles (NA : acide N-acétylneuraminique) interagissent avec l'acide sialique (SA) par le biais des résidus du domaine globulaire VP8* situé entre les résidus 93 et 208¹⁴⁰. Il résulte de cette interaction un léger changement conformationnel de VP4, qui permet au domaine VP5* de se lier aux récepteurs intégrines $\alpha 2\beta 1$.

Les résidus essentiels à la fixation de l'acide sialique ont été déterminés par mutagenèse dirigée combinée à une analyse structurale du complexe VP8*-SA obtenu par cristallographie^{35,141,142}. Ces résultats indiquent que le site de fixation de l'acide sialique se situe dans un sillon formé par les chaînes latérales des résidus R101, V144, Y155, Y188, K187, Y189 et S190 localisés à l'extrémité des têtes globulaires de VP8*.

Des mutants isolés à partir des souches NA-sensibles ont été identifiés^{143,144}. Ces mutants, tels que la souche nar3 (acide N-acétylneuraminique résistant), n'ont pas besoin d'interagir avec l'acide sialique. La caractérisation du mutant nar3, indique qu'il s'attache à la surface cellulaire en interagissant directement avec l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ par le biais de la protéine VP5*, alors que la souche sauvage (Rotavirus Simien RRV) lie l'intégrine après sa liaison initiale à une molécule d'acide sialique.

I.1.6.2.2. Interaction de VP5* avec les intégrines $\alpha 2\beta 1$

L'interaction de la protéine VP5* avec le domaine I de la sous unité $\alpha 2$ du récepteur intégrine est initiée par le changement conformationnel induit par l'interaction de la protéine

VP8* avec l'acide sialique. La liaison de la protéine VP5* au domaine I se fait par le biais d'un tripeptide DGE, allant de la position 308 à 310 dans la séquence de la protéine VP4. De plus il a été montré que seuls les résidus DG étaient essentiels pour cette interaction^{134,139,145}.

I.1.6.2.3. Interaction de VP5* avec les protéines de choc thermique « Hsc70 »

L'interaction de la protéine VP5* avec les protéines de choc thermique « Hsc70 » implique un domaine qui s'étend de la position 642 à 659 dans la séquence primaire de la protéine VP4 (VP5* + VP8*). De plus, il a été montré que l'utilisation d'un peptide synthétique mimant cette région bloque l'infectiosité du virus mais pas sa liaison cellulaire. Ces résultats indiquent que VP5* se lie aux protéines Hsc70 à une étape dite de « post-attachement »¹³⁸. D'autre part, Pérez-Vargas et al., suggèrent que l'interaction de VP5* avec les protéines Hsc70 induit un changement conformationnel au sein des particules virales facilitant ainsi leur entrée dans le cytoplasme de la cellule¹⁴⁶.

I.1.6.2.4. Interaction de la protéine VP7 avec les intégrines $\alpha\beta 3$

VP7 comporte un motif « CNP » de liaisons aux intégrines $\alpha\beta 3$. Cette séquence qui s'étend des résidus 165 à 167 est hautement conservée parmi les souches de rotavirus. Zarate et al., ont montré *in vitro* que l'utilisation d'un peptide synthétique CNP bloque l'infectiosité du virus mais pas sa liaison à la cellule¹⁴⁷.

I.1.6.2.5. Interaction de la protéine VP7 avec les intégrines $\alpha\beta 2$

L'interaction de la protéine VP7 avec les intégrine $\alpha\beta 2$ implique la séquence GPR, qui s'étend de la position 253 à 255¹³⁴. L'utilisation d'un peptide de synthèse « GPRP » induit l'inhibition de l'infectiosité des souches virales RRV (Rhesus RotaVirus) mais pas leur liaison à la cellule. Les auteurs ont donc suggéré que la liaison de VP7 aux intégrines se produit à une étape « post-attachement »¹⁴⁵.

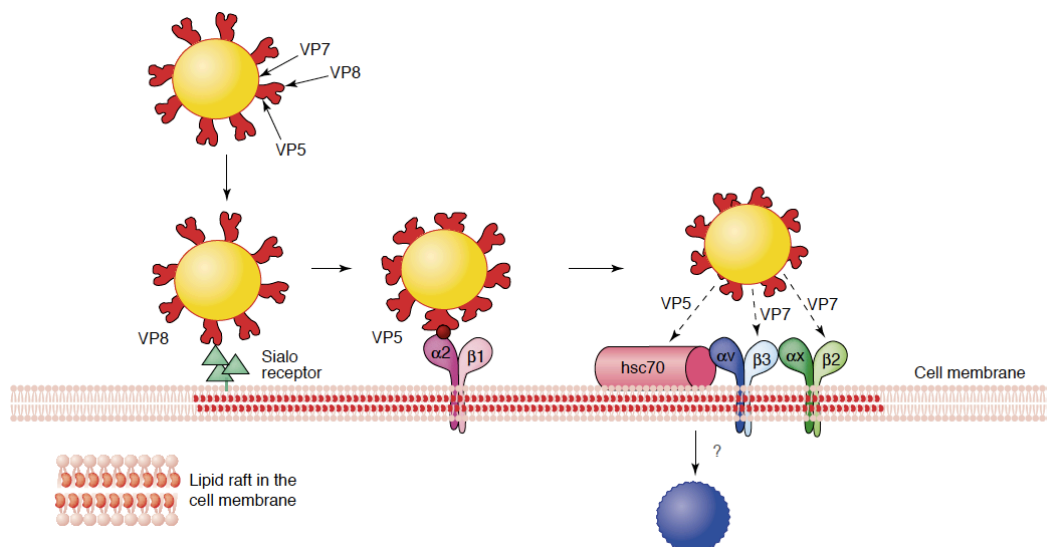


Figure I.1.6.2.1 : Modèle illustrant les premières étapes d'interaction du rotavirus avec les différents récepteurs cellulaires (d'après Lopez et al., 2004).

Les sous unités $\alpha 2$ et $\beta 3$ des intégrines ainsi que la protéine Hsc70 sont associées à des micro-domaines riches en sphingolipides et cholestérols appelés radeaux lipidiques¹⁴⁸. Il a été montré que la baisse du taux cholestérol dans la membrane cellulaire et l'inhibition de la N-glycosylation ou de la synthèse des glycolipides bloque partiellement l'infectiosité des rotavirus¹⁴⁹. Il a été ainsi suggéré que ces radeaux lipidiques pourraient être impliqués dans l'entrée des virus dans la cellule hôte¹⁴⁹.

I.1.6.3 Translocation des particules virales dans le cytoplasme

Quelle que soit la voie d'entrée, le mécanisme de translocation du rotavirus dans le cytoplasme nécessite la solubilisation de la capsid externe suivie de la perméabilisation des membranes (plasmique ou endosomale).

I.1.6.3.1. Entrée directe

Diverses approches et techniques ont permis de mettre en évidence que le mécanisme d'entrée directe du rotavirus induisait la perméabilisation des membranes plasmiques. Cette conclusion a été faite en se basant sur les différentes observations effectuées par plusieurs groupes. Ces observations sont les suivantes :

- la co-entrée des toxines (α -sarcine) dans les cellules infectées¹⁵⁰,

- la libération des marqueurs fluorescents encapsulés dans des liposomes en présence de particules virales traitées par la trypsine,
- l'utilisation des inhibiteurs d'endocytose, tels que l'azide de sodium, et le dinitrophénol ont un effet limité sur l'entrée du virus¹⁰³,
- la perméabilisation des membranes est optimale à pH neutre et est considérablement réduite à pH acide^{151,152}.
- les études par microscopie électronique montrent le passage directe des particules virales (traitées par la trypsine) à travers la membrane plasmique¹⁵³.

Une séquence dans la protéine VP5*, s'étendant des résidus 384 à 401, présentant une forte similarité avec les peptides de fusion des virus enveloppés^{154,155} a été observée. Ces peptides de fusion sont caractérisés pour leur capacité à induire la perméabilisation des membranes¹⁵⁶. Cette homologie a conduit les auteurs à associer la perméabilisation de la membrane à la protéine VP5*¹⁵⁷.

1.1.6.3.2. Entrée par endocytose

La diminution significative de l'infectiosité virale en présence de CaEGTA et de bafilomycine A1, inhibiteur des H⁺-ATPase endosomales, a incité les auteurs à proposer un mécanisme d'entrée du rotavirus par endocytose calcium-dépendent. Au cours de ce processus, la baisse de calcium due à la variation du gradient électrique impliquant les pompes à protons, entraîne la solubilisation de la capsid interne¹⁵⁸. Ce mécanisme suggéré depuis de longues années, fut confirmé récemment par Wolf et al¹⁵⁹. Bien que le mécanisme ne soit pas complètement élucidé, les auteurs ont montré d'une part que la décapsidation des particules virales s'effectue directement après l'entrée du virus dans les cellules et que d'autre part, VP4 (VP8*+ VP5*) subit une série de changements conformationnels conduisant à la libération du domaine VP8* avant la pénétration dans les cellules. Ces travaux mettent en évidence la présence de monomères de VP7 et la forme active de VP5*, forme induisant la perméabilisation des membranes, dans les endosomes primaires, tandis qu'aucune de ces protéines n'a été détectée dans l'endosome tardif¹⁵⁹.

Compte tenu de l'ensemble de ces résultats, les auteurs suggèrent que l'entrée du virus par endocytose calcium-dépendante, la décapsidation et la translocation des DLPs dans le cytoplasme sont liés aux changements conformationnels que subit la protéine VP4, conduisant ainsi à la forme active de VP5*, responsable de la perméabilisation des membranes endosomales. Néanmoins, il est important de mentionner que ces résultats

n'excluent pas la présence de fragments tryptiques de VP7 dans l'endosome, pouvant également intervenir dans le mécanisme responsable de la translocation des DLPs dans le cytoplasme après perméabilisation des membranes endosomales (objet de cette thèse).

Les travaux de Wolf et al., représentent une avancée considérable dans la compréhension du processus d'entrée du rotavirus dans la cellule selon le mécanisme d'endocytose calcium-dépendant. Cependant plusieurs questions restent sans réponse. Est-ce que ce sont les fragments VP5* ou bien les fragments tryptiques de VP7 qui sont responsables de la perméabilisation des membranes ? Quels sont les fragments tryptiques de VP7 capables de déstabiliser la membrane ? La membrane endosomale est-elle solubilisée ou bien perforée ? Quelle est la taille des pores formés par VP5* et VP7 et leurs durées de vie respectives ?

La compréhension du rôle de VP7 lors de l'entrée du rotavirus par endocytose a fait l'objet de mon travail de thèse, ce qui m'a amenée à l'identification de différents fragments tryptiques de VP7 susceptibles d'interagir avec les membranes et à la caractérisation de leur activité biologique. Ce travail m'a conduit à l'identification et la caractérisation du peptide minimum d'interaction avec les membranes, VP7₂₃, situé à l'extrémité C-terminale de VP7. J'ai pu étudier l'effet de la composition lipidique des membranes et de leur contribution électrostatique sur l'efficacité de ce peptide à perméabiliser les membranes. J'ai enfin montré que la substitution de la tyrosine Y302 par une proline conduit à la perte de l'activité biologique de VP7₂₃, tandis que la substitution de l'acide aspartique D301 par la proline induit une diminution de son efficacité à déstabiliser les membranes. Ces études m'ont amenée à me familiariser avec les différents systèmes membranaires, dans le but de mimer les propriétés physico-chimiques des membranes biologiques et pouvoir proposer un mécanisme moléculaire, basé sur la production de fragments tryptiques de VP7 participant à la perméabilisation des membranes.

Dans la suite nous allons aborder la deuxième partie de cette introduction qui résume les connaissances acquises à propos des propriétés physico-chimiques des modèles membranaires et des différents mécanismes décrits dans la littérature, expliquant l'action déstabilisatrice des peptides tryptiques sur les membranes.

I.2 Interactions peptides-membranes

I.2.1. Les propriétés des membranes et leur composition

I.2.1.1 Les membranes biologiques

I.2.1.1.1. Structure et compartimentation

Les cellules sont considérées comme étant les unités structurales, fonctionnelles et fondamentales des systèmes vivants. Observées pour la première fois en 1655 par Robert Hooke, ces unités se partagent en deux types. Tout d'abord, les cellules procaryotes, caractérisées par une organisation interne simplifiée, possédant une membrane constituée majoritairement de phosphatidylglycérol, phosphatidylsérine ou cardiolipine et très rarement de stérols. Les cellules eucaryotes, quant à elles, possèdent une structure interne plus complexe et une membrane présentant une distribution asymétrique de phospholipides. Néanmoins, dans chacun des deux types cellulaires, la membrane plasmique joue un rôle majeur car elle permet de délimiter le contenu cellulaire du milieu extérieur tout en favorisant les échanges contrôlés. En effet, le contenu de ces dernières est divisé en plusieurs compartiments fonctionnels, formant les organites intracellulaires entourés par une, ou deux membranes Figure I.2.1.1.1.1.

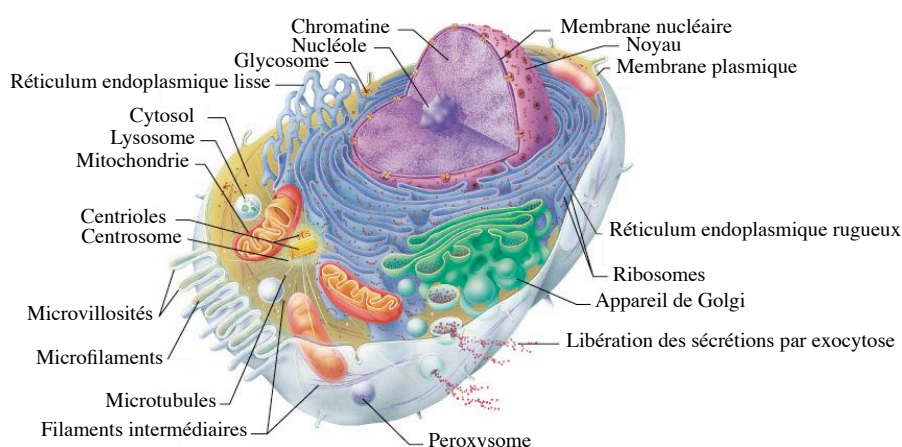


Figure I.2.1.1.1.1 : Représentation schématique d'une cellule eucaryote avec l'ensemble des organites qui la composent (Copyright © 2001 Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc).

Traversée par un grand nombre et une grande diversité de protéines, la fonction des membranes biologiques ne se restreint pas à celle de cloisonnement, elles sont aussi

impliquées dans de nombreux processus biologiques tels que le stockage, l'échange d'énergie, le transport et la signalisation.

La découverte du modèle « de la mosaïque fluide » par Singer en 1972 a constitué une avancée majeure¹⁶⁰. Selon ce modèle les membranes biologiques sont organisées en bicouche lipidique dynamique (Figure I.2.1.1.1.2), caractérisées par des têtes polaires délimitant un cœur hydrophobe renfermant protéines et glycoprotéines. De plus ce modèle tient compte des mouvements des protéines, des glycoprotéines mais également du basculement des lipides d'un feuillet à l'autre appelé flip-flop, des diffusions latérales, des rotations libres et des oscillations des lipides sur leur axe. Ces mouvements sont rendus possibles grâce à la nature et aux propriétés physico-chimiques des lipides. En effet lorsque la température est supérieure à la température de transition de phase (T_m) des chaînes grasses, le cœur hydrophobe se caractérise par une faible viscosité. La baisse de la température ($T < T_m$) entraîne un basculement vers la phase solide gel, ce qui conduit à une répression des mouvements essentiels pour l'activité cellulaire.

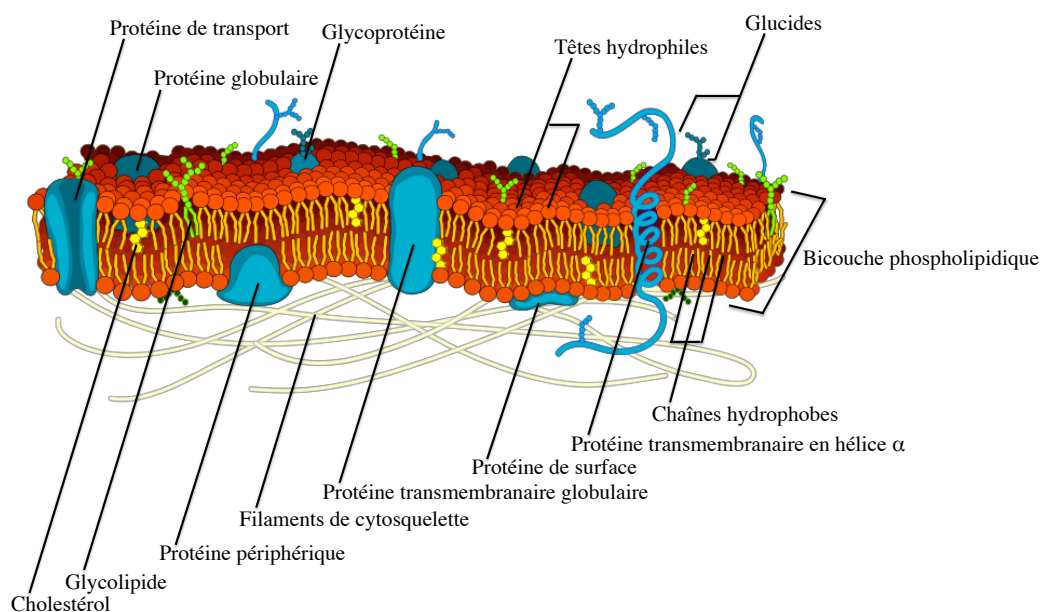


Figure I.2.1.1.1.2 : Représentation schématique d'une membrane cellulaire eucaryote. « Sources : Wikipedia, the free encyclopedia ».

Depuis la conception de ce modèle les connaissances ne cessent de s'améliorer, cependant l'organisation des membranes à l'échelle moléculaire sont toujours sujet à débat. Les travaux récents d'Estep et al. (1979)¹⁶¹, de Simons et al. (1997)¹⁶² et de Brown et al.

(1997)¹⁶³ représentent une évolution de ce modèle. Selon ces auteurs, les membranes biologiques ne se réduisent pas uniquement à une bicouche lipidique homogène dissimulant des protéines mais d'autres microdomaines peuvent co-exister.

I.2.1.1.2. Composition et asymétrie

Les propriétés physico-chimiques des membranes plasmiques sont liées aux différents lipides qui la constituent. Les espèces lipidiques différentes¹⁶⁴ varient en fonction de la nature des organites et des types cellulaires^{165,166} (Figure I.2.1.1.2.1). Ils représentent environ 40 % de la masse totale de la membrane biologique, avec une concentration qui approche les 5.10^6 molécules de lipides par μm^2 de bicouche lipidique.

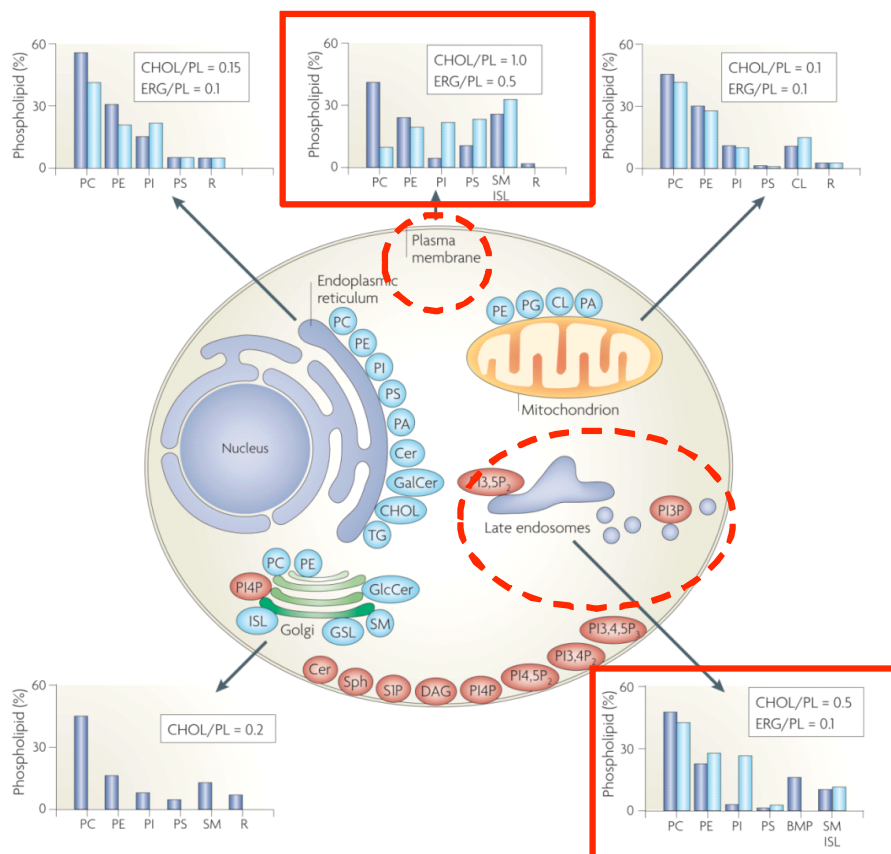


Figure I.2.1.1.2.1 : Composition lipidique des différents compartiments cellulaires chez les eucaryotes (d'après Van Meer et al., 2008). Les données sont exprimées en pourcentage par rapport au nombre total de lipides dans les cellules des mammifères (bleu foncé) et la levure (bleu clair). Sur ce schéma, la différence de composition en cholestérol (CHOL) entre les différents compartiments est très significative au niveau des membranes plasmiques et endosomales.

Au-delà d'une concentration de l'ordre de 10^{-5} M, les molécules lipidiques s'associent de façon à minimiser les jonctions entre leurs chaînes aliphatiques et les molécules d'eau. Les chaînes hydrophobes se font face à cause de leur affinité réciproque, tandis que les têtes polaires s'orientent vers les molécules d'eau, principale composante des cellules. Cette organisation est stabilisée par les liaisons chimiques de faible énergie telles que les interactions hydrophobes ou de van der Waals. D'autre part, il est important à noter que la géométrie des chaînes grasses est fonction du nombre d'insaturations et que les lipides sont classés en fonction de leur structure en trois familles : les glycérophospholipides, les sphingolipides et les stérols.

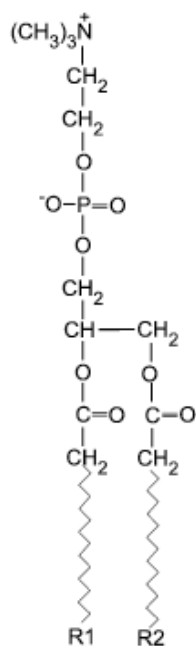
I.2.1.1.2.1 Les glycérophospholipides

C'est la famille de lipides la plus répandue, elle regroupe la phosphatidylcholine (PtdCho), la phosphatidyléthanolamine (PtdEtn), la phosphatidylsérine (PtdSer), la phosphatidylinositol (PtdIns) et l'acide phosphorique (PA) (Figure I.2.1.1.2.1.1). Ces lipides possèdent un squelette hydrophobe constitué de diacylglycérol (DAG), avec des chaînes grasses contenant ou pas des insaturations qui sont le plus souvent en *cis*, cependant il est possible d'avoir des insaturations en *trans*.

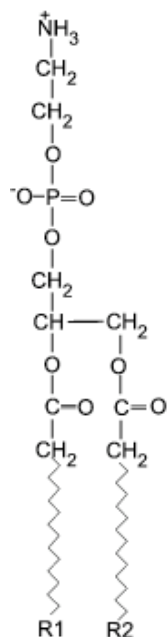
Les phosphatidylcholines représentent plus de 50 % des phospholipides présents dans les membranes eucaryotes, ils s'auto-organisent spontanément en bicouche plane, dans laquelle chaque molécule de PtdCho a une géométrie à peu près cylindrique. De plus l'insaturation *cis* des chaînes aliphatiques de ces molécules les rend fluide à température ambiante.

Les molécules de phosphatidyléthanolamine adoptent une géométrie conique, en raison de la taille relativement petite des têtes polaires. L'introduction de phosphatidyléthanolamine dans une bicouche constituée de phosphatidylcholine, impose une contrainte de courbure négative au niveau de la membrane qui est essentielle pour les processus de bourgeonnement, de fission et de fusion¹⁶⁷.

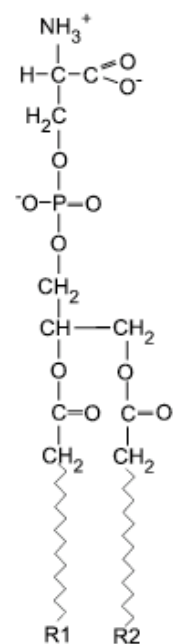
Les lipides tels que la phosphatidyléthanolamine et la cardiolipine (Figure I.2.1.1.2.1.1) ne peuvent pas former de bicouche mais jouent un rôle important au niveau des membranes biologiques en favorisant l'insertion des protéines et la modulation de leurs activités biologiques¹⁶⁸.



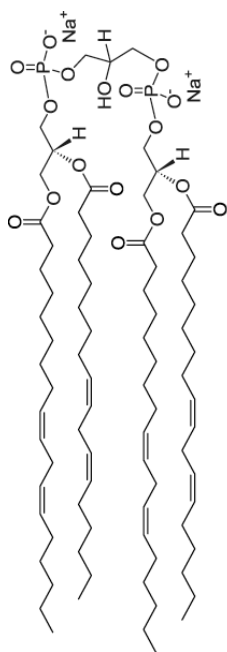
Phosphatidylcholine



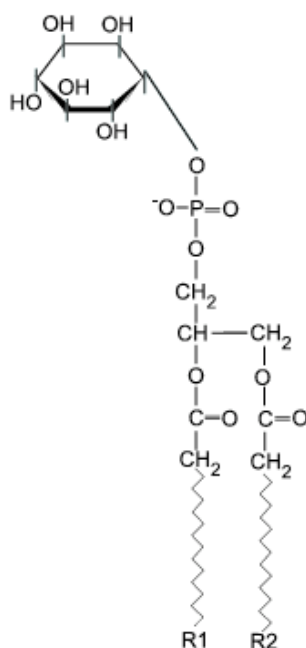
Phosphatidyléthanolamine



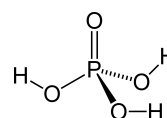
Phosphatidylsérine



Cardiolipine



Phosphatidylinositol

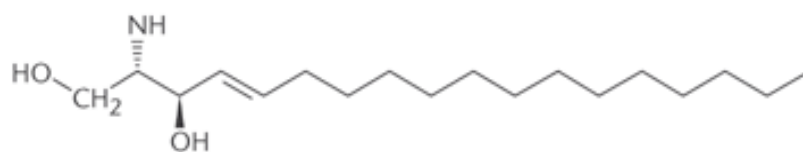


Acide phosphorique

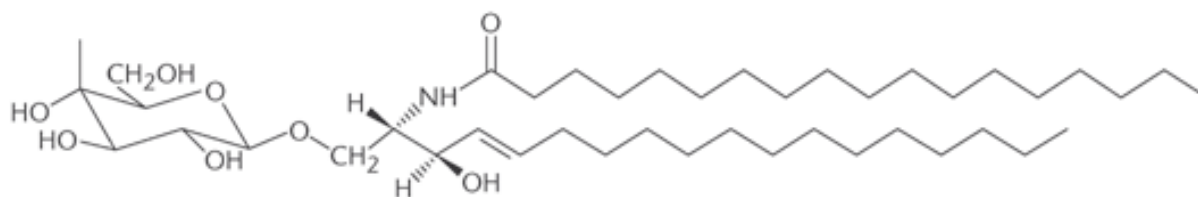
Figure I.2.1.1.2.1.1 : Les composants lipidiques majoritaires de la famille des glycérophospholipides (source : Avantis Polar Lipids et « Probing Lipid Membrane Electrostatics » par Yi Yang ; page 2.)

I.2.1.1.2.2 Les sphingolipides

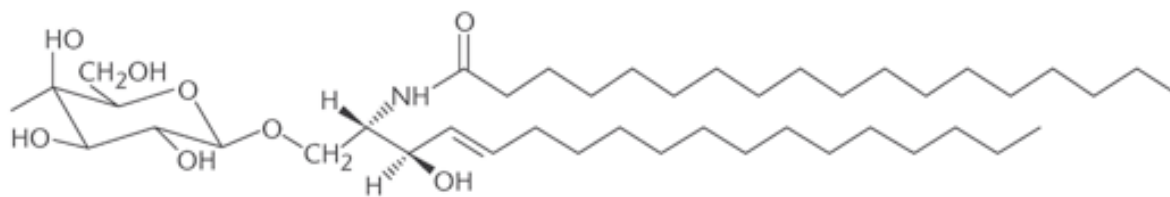
Les sphingolipides constituent une autre classe de lipides possédant un squelette hydrophobe appartenant à la sous-classe des céramides. Chez les mammifères cette famille regroupe majoritairement la sphingomyéline (SM) et les glycosphingolipides (GSL) qui contiennent des mono- ou di- oligosaccharides, constitués de glucosylcéramide et parfois des galactosylcéramides^{169,170}, (Figure I.2.1.1.2.2.1). La présence des sphingolipides au niveau du feuillet externe des membranes eucaryotes est essentielle pour le bon déroulement de nombreux processus, tels que la signalisation et le tri des protéines¹⁷⁰.



Sphingomyéline



Glucosylcéramides



Galactosylcéramides

Figure I.2.1.1.2.2.1 : Les principaux lipides de la famille des sphingolipides chez les mammifères (source : *Glycolipids animal*. Hakmori Sen-ition et Ishizuka Ineo., 2006)

I.2.1.1.2.3 Les stérols

Cette famille qui regroupe le cholestérol et ses dérivés, possède un noyau stérane qui porte un groupement hydroxyle au niveau du carbone 3 (Figure I.2.1.1.2.3.1). Le cholestérol représente la forme la plus répandue de cette catégorie de lipides membranaires chez les vertébrés. Il est présent plus particulièrement dans les membranes érythrocytaires, les membranes plasmiques et dans différents compartiments sub-cellulaires.

Les molécules planes de cholestérol sont constituées d'un squelette hydrocarboné à quatre cycles rigides, adoptant une configuration trans et un groupement hydroxyle en position 3, correspondant à la partie polaire qui lui confère un caractère amphipathique.

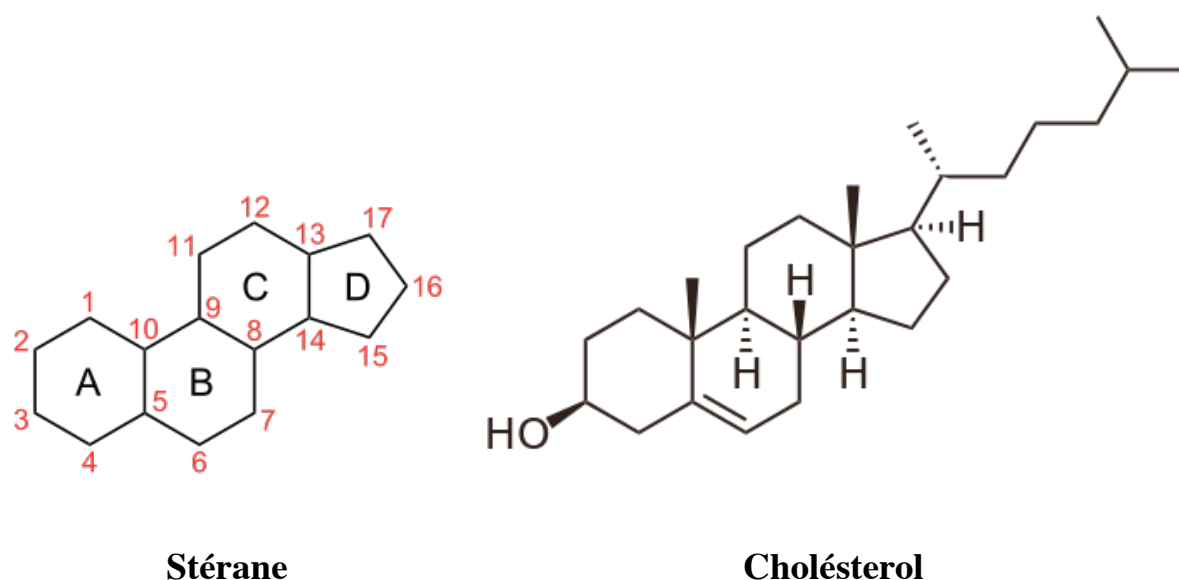


Figure I.2.1.1.2.3.1 : Formule chimique du stérane et du cholestérol. Les quatre cycles rigides nommés A, B, C et D adoptent une conformation trans.

Les propriétés physico-chimiques des molécules de cholestérol leurs permettent de s'insérer dans les membranes, de sorte que la partie hydrophile soit orientée vers les têtes polaires (Figure I.2.1.1.2.3.2), tandis que la partie hydrophobe s'insère au niveau du cœur hydrophobe¹⁷¹⁻¹⁷³. Leur présence au niveau de la membrane module profondément sa structure, ses propriétés physiques et sa dynamique. Le cholestérol induit une augmentation du paramètre d'ordre au niveau des chaînes alkyles des lipides, ce qui conduit à une

augmentation de la rigidité et de l'épaisseur des membranes, tout en maintenant une certaine flexibilité et mobilité des différents composants de la membrane.

Différents travaux effectués par plusieurs groupes mettent en évidence l'importance du cholestérol dans de nombreux processus biologiques tels que l'infection, la réplication (du VIH-1 et d'autre rétrovirus)¹⁷⁴ et l'endocytose clathrine-dépendante^{175,176} de la transferrine et du facteur de croissance épidermique. Il est également impliqué dans le mécanisme d'exocytose, puisque la déplétion en cholestérol induit la dispersion des clusters de protéines SNAREs, impliquées dans l'initiation de la fusion membranaire, conduisant à une réduction massive des vésicules de sécrétion¹⁷⁷.

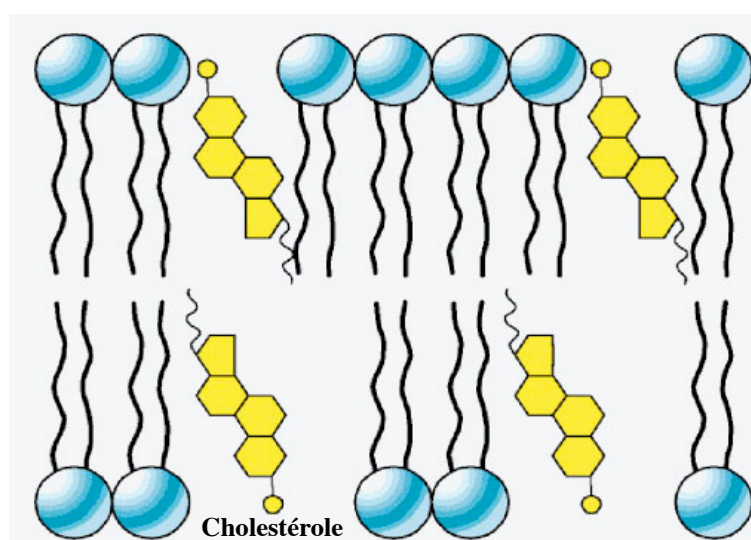


Figure I.2.1.1.2.3.2 : Représentation schématique de l'insertion du cholestérol au niveau des membranes.

Source : <http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lectf03am/cholesterol.jpg>.

La composition des membranes biologiques est qualifiée d'asymétrique¹⁷⁸⁻¹⁸², puisque la répartition des lipides varie au sein des deux feuillets mais également au sein d'un même feuillet. La Figure I.2.1.1.2.2 qui illustre la distribution de quatre phospholipides différents au niveau des membranes des érythrocytes humains¹⁸², indique que la phosphatidylcholine et la sphingomyéline sont localisées principalement au niveau du feuillet externe, contrairement à la phosphatidyléthanolamine et la phosphatidylsérine qui sont situées dans le feuillet interne.

D'autre part, il est important à noter que le cholestérol est caractérisé par une capacité de flip-flop assez rapide entre les deux feuillets membranaires, ce qui conduit à sa répartition d'une manière symétrique dans les membranes biologiques.

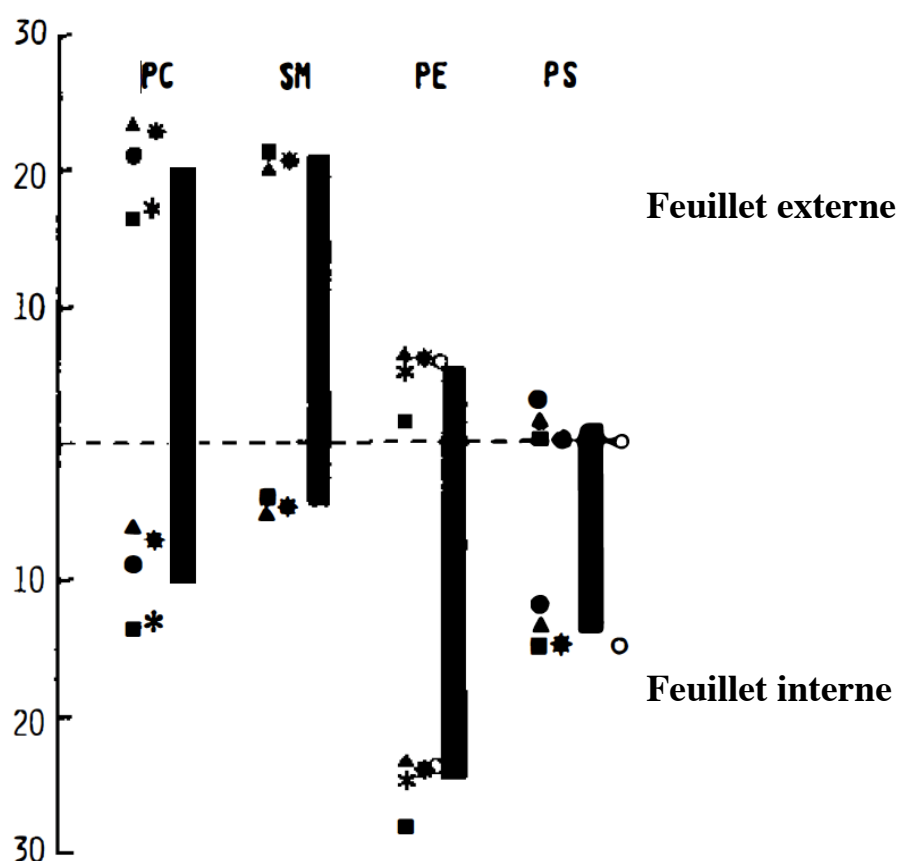


Figure I.2.1.1.2.2 : Schéma représentatif de la répartition des quatre principaux lipides des membranes des érythrocytes humains au sein des deux feuillettes (d'après Devaux, P. F. 1992). Les résultats sont exprimés en pourcentage de fraction totale de lipide.

I.2.1.2 Des molécules amphiphiles aux systèmes auto-organisés

Amphiphiles par nature, les lipides restent sous forme monomérique en milieu aqueux à l'interface air-eau, tant que leur concentration est inférieure à une valeur dite « concentration micellaire critique ». Au-delà de cette concentration les lipides disposent d'une grande capacité d'auto-organisation, qui entraîne la formation d'objets de taille et de morphologie différentes^{183,184} (Figure I.2.1.2.1). En effet en présence d'eau les chaînes aliphatiques hydrophobes forment des pseudo-phases organiques, stabilisées par les interactions attractives entre les différentes parties hydrophobes. Il résulte de cette organisation une réduction des interactions entre les chaînes hydrophobes et les molécules d'eau, tandis que la solvation des têtes polaires est favorisée. On peut donc résumer la formation de ces objets comme étant la résultante d'un équilibre entre les forces attractives et répulsives et que l'énergie totale du système correspond à la somme de ces énergies. Sur le plan thermodynamique, l'agréation

des lipides qui conduit à la formation des différents objets est la conséquence des variations d'entropie du système¹⁸⁵.

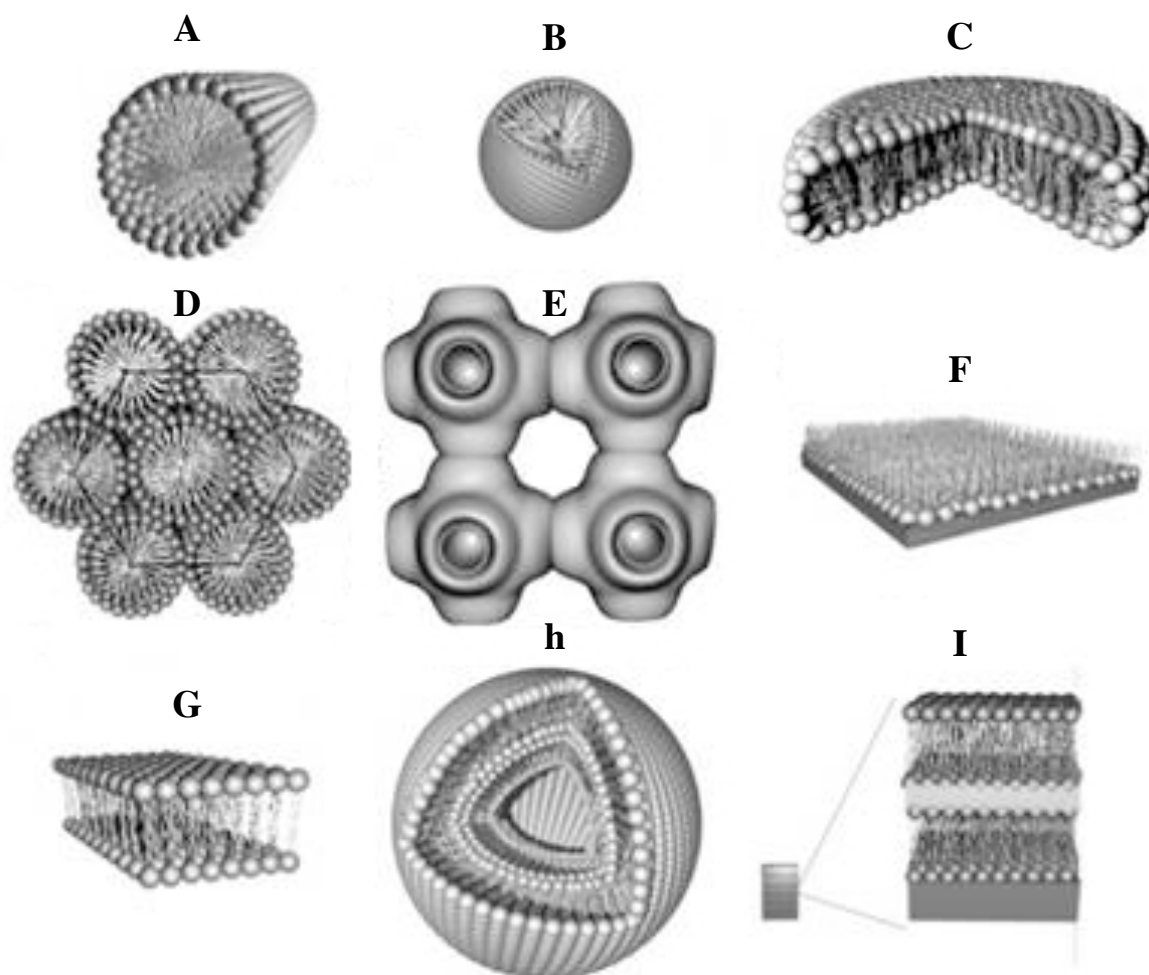


Figure I.2.1.2.1 : Représentation schématique des différentes organisations que peuvent adopter les lipides en milieu aqueux. A. micelles cylindriques ; B. micelles ; C. bicelles ; D. phase hexagonale ; E. phase cubique inverse ; F. monocouche lipidique ; G. bicouche lamellaire ; H. vésicule lamellaire ; I. phase lamellaire.

L'énergie n'est pas le seul facteur favorisant la formation et la variation morphologique des agrégats lipidiques. Israelachvili et al en 1976¹⁸⁶, ont montré l'importance des contraintes géométriques imposées par la structure des lipides lors de la formation des différents objets (Figure I.2.1.2.2). D'après leurs conclusions, elles sont la conséquence directe des interactions qui peuvent s'établir entre les molécules amphiphiles. Ainsi, ils ont défini un paramètre d'empilement « ρ », tel que décrit dans l'équation 1.

$$\rho = \frac{v}{a_0 l_c} \quad Eq\ 1$$

Ce paramètre varie de manière proportionnelle avec le volume « v » des têtes polaires des lipides, il dépend également de l'aire des têtes polaires (a_0) et de la longueur « critique » (l_c) des chaînes grasses. Dans le modèle d'Israelachvili, l_c correspond à la taille maximale pour laquelle la chaîne aliphatique est fluide et non immobilisée dans une structure cristalline.

Il est important de noter, que les trois facteurs qui définissent le paramètre d'empilement, peuvent fluctuer en fonction de la température, de la pression, du pH, de la force ionique et de la concentration en lipides. En effet, l'impact de la salinité du milieu sur la formation de vésicules géantes par électro-formation a été mis en évidence par Angelova qui a montré qu'en présence de concentrations élevées de sel, les répulsions électrostatiques entravent l'auto-organisation des phospholipides en bicouche¹⁸⁷.

1.2.1.3 Des membranes biologiques aux membranes modèles

La complexité des membranes biologiques, conduit le plus souvent à l'utilisation de modèles membranaires, visant à comprendre et à déterminer les mécanismes biologiques qui se déroulent à la surface des membranes biologiques. L'avantage de ces modèles membranaires est la possibilité d'en contrôler la taille et la composition lipidique. Ainsi la nature des membranes modèles, bicouche, micelle ou autre, adaptée à différentes utilisations, peut être modulée par le choix de la composition lipidique.

Dans le cadre de nos études, nous avons utilisé des compositions lipidiques différentes à des concentrations supérieures à la concentration micellaire critique (CMC). Les lipides utilisés lors des études structurales par RMN et dichroïsme circulaire, possèdent un paramètre d'empilement $\rho < 1/3$, permettant ainsi la formation de micelles, suffisamment grandes pour permettre une bonne structuration et stabilisation du peptide. De plus, contrairement aux différents systèmes membranaires modèles, les micelles sont suffisamment petites pour restreindre la taille des complexes peptide-micelle et réduire ainsi la diffusion de spin lors de l'étude RMN. Nous avons également utilisé les lipides ayant un paramètre d'empilement « ρ », tel que $1/2 < \rho \leq 1$, conduisant ainsi à la formation de vésicules unilamellaires.

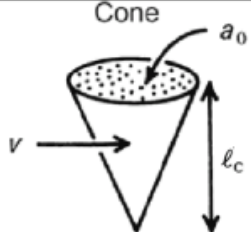


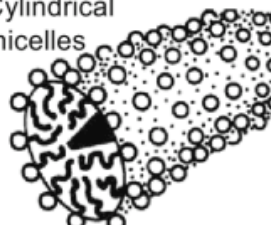

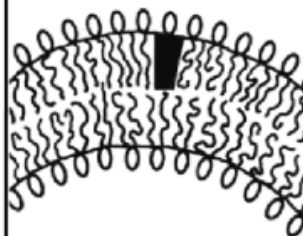

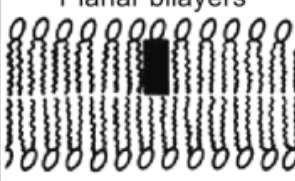
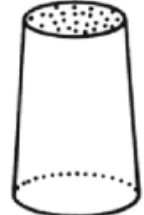
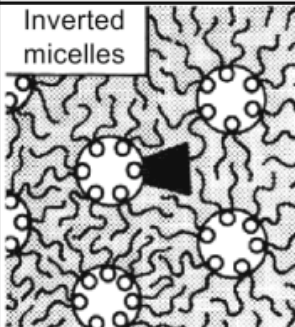
Lipid	Critical packing parameter $v/a_0\ell_c$	Critical packing shape	Structures formed
Single-chained lipids (surfactants) with large head-group areas: <i>SDS in low salt</i>	$< 1/3$	Cone 	Spherical micelles 
Single-chained lipids with small head-group areas: <i>SDS and CTAB in high salt, nonionics</i>	$1/3-1/2$	Truncated cone 	Cylindrical micelles 
Double-chained lipids with large head-group areas, fluid chains: <i>Phosphatidyl choline (lecithin), Phosphatidyl serine, Phosphatidyl glycerol, Phosphatidyl inositol, Phosphatidic acid, sphingomyelin, DGDG^a, dihexadecyl phosphate, dialkyl dimethyl ammonium salts</i>	$1/2-1$	Truncated cone 	Flexible bilayers, vesicles 
Double-chained lipids with small head-group areas, anionic lipids in high salt, saturated frozen chains: <i>phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl serine + Ca²⁺</i>	~ 1	Cylinder 	Planar bilayers 
Double-chained lipids with small head-group areas, nonionic lipids, poly (<i>cis</i>) unsaturated chains, high <i>T</i> : <i>unsat. phosphatidyl ethanolamine, cardiolipin + Ca²⁺, phosphatidic acid + Ca²⁺, cholesterol, MGDG^b</i>	> 1	Inverted truncated cone or wedge 	Inverted micelles 

Figure I.2.1.2.2 : Représentation schématique des relations qui existent entre le paramètre de compactage « p » et la structure formée par les différents lipides (d'après Israelachvili 1985).

I.2.2. Etudes mécanistiques des interactions peptides lytiques-membranes

I.2.2.1 Introduction

Les membranes biologiques dont l'épaisseur varie entre 7 nm et 8 nm sont le support de plusieurs fonctions essentielles, incluant les interactions avec des peptides lytiques. Ces interactions jouent un rôle important dans de nombreux processus, tels que les mécanismes de défense antimicrobiens¹⁸⁸⁻¹⁹⁰, la fusion membranaire¹⁹¹⁻¹⁹³ ou bien la translocation virale¹⁹⁴.

Les peptides lytiques sont en général courts et chargés positivement et les structures qu'adoptent ces peptides sont de trois types : hélice α , feuillet β stabilisés par un ou plusieurs ponts disulfures ou une combinaison des deux¹⁹⁵ telle qu'indiqué dans la Figure I.2.2.1.1. Cependant le groupe des peptides en hélice α amphiphile est le plus étudié et le mieux décrit. Ces peptides possèdent généralement de 40% à 60% de résidus hydrophobes¹⁹⁶ et sont souvent peu structurés en milieux aqueux. Les peptides tels que l'hémolysine, une exotoxine produite par des bactéries comme le streptocoque et le staphylocoque qui induisent la lyse des globules rouges, adoptent généralement une structure secondaire en hélice droite au contact de la membrane ou dans un environnement mimant la membrane. Cependant, on trouve également quelques structures coudées par la présence d'un ou plusieurs résidus proline telles que la mélittine, principal composant toxique du venin de l'abeille à miel européenne, ou bien le peptide pep46 du virus de la Bursite Infectieuse Aviaire, destabilisateur de membranes cellulaires permettant l'entrée du virus dans la cellule cible.

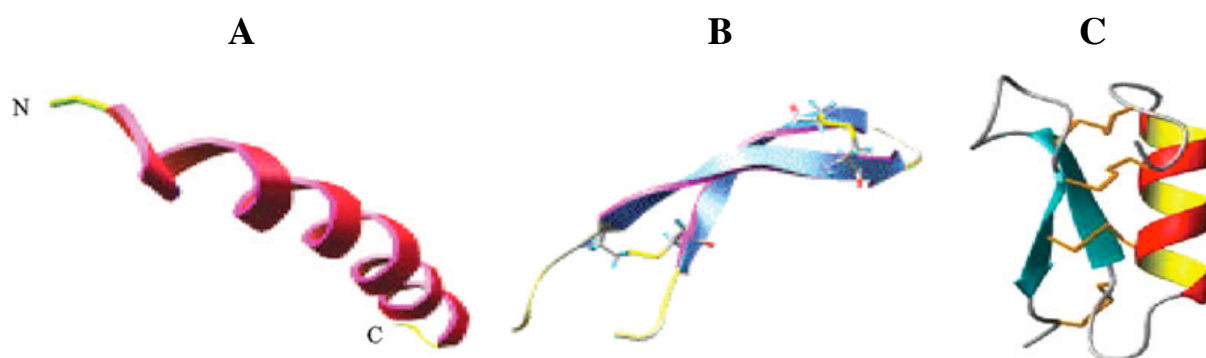


Figure I.2.2.1.1 : Structures tertiaires de peptides lytiques (d'après Bullet et al., 2004). *A. Structure en hélice α amphiphile de la magainine. B. Structure en feuillet β de la protégrine I, les ponts disulfures sont représentés en jaune. C. Structure mixte en hélice α et en feuillet β de défensine I, le feuillet est stabilisé par les ponts disulfures indiqués en orange.*

I.2.2.2 Les différents modes d'actions des peptides lytiques

La majorité des travaux effectués sur les peptides lytiques mettent en évidence sans ambiguïté, qu'ils ont pour principale fonction de perturber l'intégrité de la bicouche lipidique. Il a été montré que l'interaction des peptides avec les membranes affecte généralement le thermotropisme des phases lamellaires. Au cours de ce processus la température de transition gel-fluide des chaînes aliphatiques reste inchangée, tandis que l'énergie de transition diminue progressivement¹⁹⁷.

Les modes d'actions des peptides lytiques sont très divers¹⁹⁸⁻²⁰¹, ils seront abordés dans cette partie selon deux catégories : ceux qui induisent la formation de pores et ceux qui entraînent la destruction des membranes par « micellisation ». Ces mécanismes largement étudiés, découlent de plusieurs travaux effectués sur des peptides de référence tels que la δ -Lysine^{202,203}, la dermaseptine²⁰⁴ ou bien la maganine 2²⁰⁵, et débutent tous par une première étape d'adsorption des peptides à la surface de la membrane. Cette première étape est caractérisée par deux états, qui sont régis par de nombreux paramètres tels que la composition en phospholipides²⁰⁶, le degré d'hydratation de la membrane^{207,208}, la fluidité membranaire ou la concentration en peptides. Ce modèle à deux états^{209,210} « two-state model » stipule qu'à faible rapport peptides/lipides, le peptide adsorbé sur les têtes polaires est orienté parallèlement à l'interface de la bicouche lipidique (Figure I.2.2.2.1. A), alors que l'augmentation de ce rapport entraîne une réorientation (Figure I.2.2.2.1. B) du peptide, par rapport à l'interface et conduit à l'initiation du mécanisme de lyse.

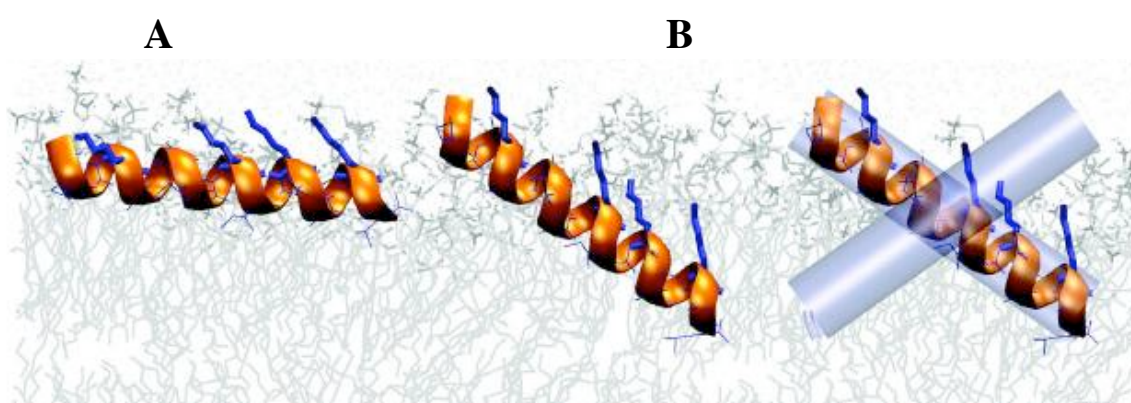


Figure I.2.2.2.1 : Modèle à deux états illustrant la réorganisation de la PGla observée dans une membrane modèle de DMPC (Glaser et al., 2005). (A). A faible concentration en peptide l'hélice est parallèle à la surface membranaire. (B). L'augmentation de la concentration entraîne une réorientation de l'hélice.

I.2.2.2.1. Mécanisme de la formation des pores

I.2.2.2.1.1 Modèle du pore mixte ordonné ou désordonné « toroïdal pore »

Connu également sous le nom de « wormhole model », ce modèle a été proposé pour la première fois par deux équipes différentes^{205,211} à partir des observations effectuées sur la maganine. Au cours de ce processus les hélices α amphiphiles s'insèrent généralement de façon perpendiculaire à la surface de la membrane, induisant des « flip-flop » rapides des lipides et des courbures positives des bicouches lipidiques. Il en résulte ainsi la création d'un complexe dynamique peptide/lipide formant un pore mixte ordonné dont le lumen est constitué des faces hydrophiles des peptides et des têtes polaires des lipides, tandis que leurs chaînes aliphatiques interagissent avec les faces hydrophobes des hélices (Figure I.2.2.2.1.1.1. A). Il est important à noter qu'il est possible d'observer des pores mixte désordonnés, dans ce cas les hélices s'insèrent dans la membrane sans orientation préférentielle^{190,212}, formant des pores non cylindriques, tel que l'on décrit Leontiadou et al (Figure I.2.2.2.1.1.1. B).

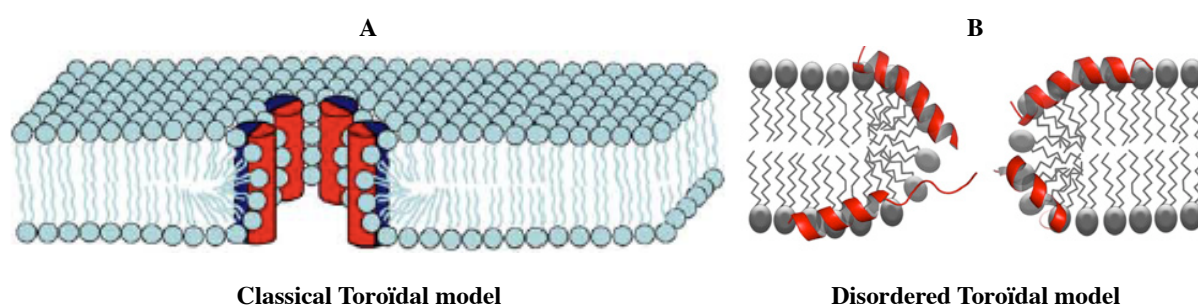


Figure I.2.2.2.1.1.1 : Schéma représentatif du modèle du pore mixte « toroïdal ». A) ordonné proposé par Matsuzaki et Ludtke (d'après Chan et al., 2006). B) désordonné proposé par Leontiadou (d'après Sengupta et al., 2008). Les peptides s'associent avec les membranes de sorte que les parties hydrophiles de chaque hélice (en rouge) interagissent avec les têtes polaires des lipides tandis que leurs chaînes aliphatiques interagissent avec les faces hydrophobes (en bleu). Ces structures forment un complexe dynamique peptide/lipide créant un pore.

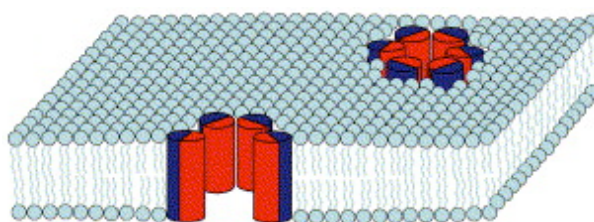
I.2.2.2.1.2 Modèle du pore en tonneau « barrel-stave model »

C'est le processus classique pour décrire la formation des pores dans les membranes lipidiques (Figure I.2.2.2.1.2.1). Dans ce modèle, les peptides forment un amas dans la membrane ayant un espace central délimité par les surfaces hydrophiles des hélices

amphiphiles, tandis que les faces hydrophobes s'alignent avec les chaînes aliphatiques des lipides^{213,214}.

Les peptides interagissant selon ce mécanisme sont caractérisés par un grand potentiel d'auto-association, par un caractère hydrophobe très important (nécessaire à la stabilité du pore) et doivent être suffisamment longs pour pouvoir traverser la membrane biologique.

La parfaite illustration de modèle correspond aux pores formés par l'alaméthicine^{214,215}, un peptide de 20 acides aminés, isolé du champignon *Trichoderma* et connu pour sa capacité à perméabiliser les membranes bactériennes. La taille des pores formés par ce peptide dépend du rapport peptide/lipide. Néanmoins, il a été décrit que l'interaction de ce peptide avec les membranes de DLPC, conduit à la formation de pores dont les diamètres internes et externes ont été estimés à 1.8 nm et 4 nm respectivement et que chaque pore contient entre 8 ou 9 monomères²¹⁶.



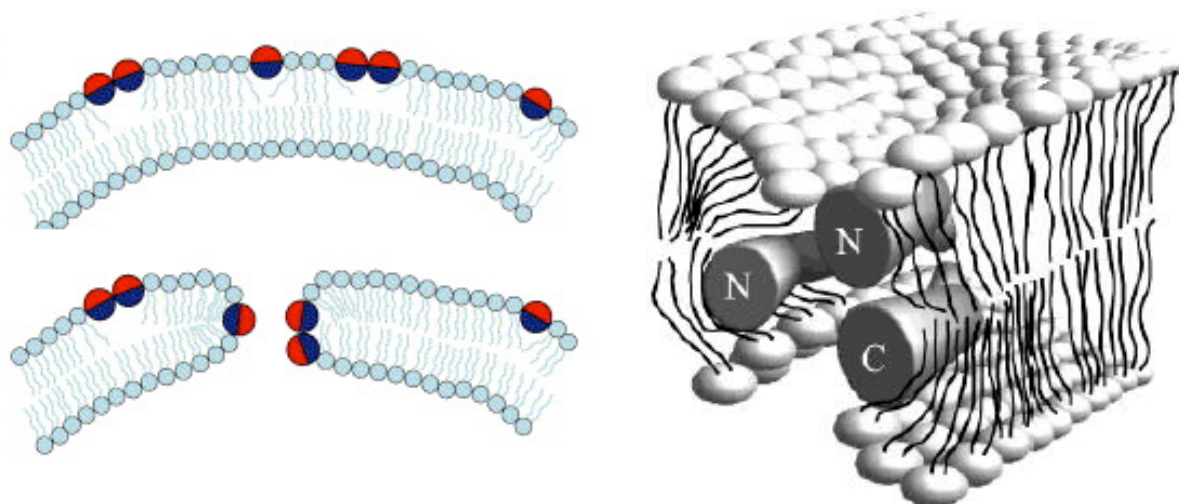
Barrel-stave model

Figure I.2.2.2.1.2.1 : Schéma représentatif du modèle du pore en tonneau « barrel-stave model », d'après Chan et al., 2006. Le peptide adopte une configuration en hélice α , se lie à la membrane, s'agrège et s'insère dans les bicouches lipidiques. Les régions hydrophobes (bleu) des hélices s'alignent avec les chaînes hydrocarbonées des phospholipides tandis que les faces hydrophiles (rouge) forment l'intérieur du pore.

I.2.2.2.1.3 Le modèle du radeau coulant « sinking-raft model »

Ce modèle très original a été proposé pour la première fois en 2002 par Pokorny et al^{202,203,217}, dans ce cas les peptides en hélices α amphipathiques se répartissent de façon hétérogène parallèlement à la surface de la membrane générant ainsi un déséquilibre de masses à travers la bicouche lipidique avec une augmentation conséquente de la courbure membranaire. Il en résulte de ces phénomènes la translocation du peptide à travers la bicouche et la formation d'un pore transitoire, tel que cela a été décrit pour la δ -lysine, un peptide antimicrobien d'origine bactérienne (Figure I.2.2.2.1.3.1). Le trimère de la δ -lysine se

forme à la surface de la membrane et s'enfonce progressivement dans la bicouche d'une manière analogue à un radeau qui coule, accompagné d'une légère flexion des hélices.



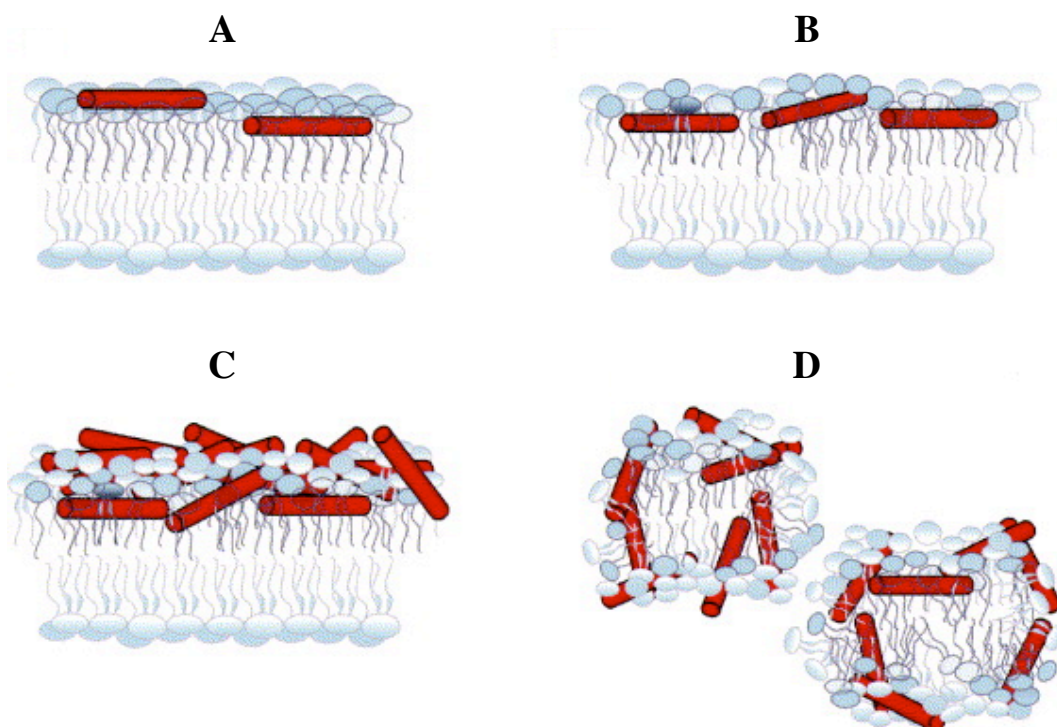
Sinking-raft model

Figure I.2.2.2.1.3.1 : Schéma représentatif du modèle du radeau coulant « sinking-raft model », d'après Pokorny., 2002. Le peptide adopte une configuration en hélice coudée au milieu, au niveau du résidu Trp15, de sorte que les résidus hydrophobes soient orientés vers les chaînes aliphatiques des lipides.

I.2.2.2. Mécanisme de formation des micelles

I.2.2.2.1 Le modèle du tapis ou détergent « carpet-like model »

Ce modèle qui prend en compte le mode d'action des cécropines, a été proposé pour la première fois par Steiner et al²¹⁸. Ce mécanisme est basé sur la désintégration progressive de la membrane en fonction de la concentration en peptide. Au cours de ce processus les peptides agissent comme un détergent. À faible concentration, les peptides peuvent avoir un faible effet sur les membranes, ou bien engendrer la formation de micelles et de pores transitoires. Alors qu'à forte concentration les peptides entraînent une perturbation de la courbure membranaire conduisant ainsi à sa désintégration (Figure I.2.2.2.1.1).



Carpet-like model

Figure I.2.2.2.1.1 : Schéma représentatif du modèle du tapis ou detergent « Carpet-like model » « Detergent-like model », d'après Sato et al., 2002. Le peptide adopte une configuration en hélice α et s'oriente de manière parallèle à la surface de la membrane (A). Il s'accumule progressivement (B) couvrant ainsi la totalité de la bicouche lipidique (C), il entraîne ainsi une désintégration totale de la bicouche en agissant comme un détergent (D).

Chapitre II: Matériels et Méthodes

II. Matériels et Méthode

II.1.1. Recherche de région membranaire

Cette étude a été menée dans le but d'identifier un domaine potentiel d'interaction avec la membrane, puisqu'il a été démontré par Charpilienne et al. en 1997¹²⁸ que des fragments peptidiques issus de la maturation trypsique de la glycoprotéine VP7 sont capables de perméabiliser des vésicules lipidiques. Dans un premier temps, une étude de prédiction de domaines membranaires a été réalisée en utilisant le programme PHDhtm²¹⁹ et MPEX. Ce programme permet d'avoir une grande précision sur la prédiction de structures secondaires et l'accessibilité au solvant, des protéines ou peptides, en utilisant les informations contenues dans les alignements multiples de séquences. Des prévisions pour 13 protéines, de structures connues, ont été générées automatiquement par Burkhard Rost et Chris Sander en utilisant PHDhtm, les résultats indiquent l'estimation de la prédiction avec une précision de 72%. Ces travaux sont un outil utile comme point de départ pour notre étude.

La recherche d'une région membranaire avait été consolidée dans un premier temps par une prédiction des éléments de structure secondaire par l'utilisation du serveur de prédiction de structures secondaires PSIPRED²²⁰. Le serveur PSIPRED comprend trois méthodes récentes, PSIPRED, GenTHREADER et MEMSAT 2. . PSIPRED²²¹ effectue une prédiction de la structure secondaire uniquement à partir de sa séquence primaire en acides aminés. GenTHREADER²²² rapidement et de manière fiable reconnaît le repliement d'une protéine et MEMSAT²²³ permettant ainsi de déduire la structure et la topologie des protéines membranaires.

Une représentation en roue hélicoïdale permettant de mettre en évidence les propriétés hydrophobes des hélices a été effectuée en utilisant le logiciel Helical Wheel Projection (Helical Wheel Projection <http://rzlab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi>).

II.1.2. Identification des sites de maturation par la trypsine

Un alignement multiple des différentes séquences de la glycoprotéine a été effectué afin de déterminer les résidus Arginines et Lysine hautement conservés dans la glycoprotéine VP7, puis l'ensemble de ces résidus situés du côté C-terminal, entourant la région membranaire prédite, ont été reporté sur la structure tridimensionnelle de VP7 native déterminée par cristallographie aux rayons X³³, afin de vérifier l'accessibilité de ces différents résidus pour la trypsine.

II.1.3. Synthèse peptidique en phase solide, purification et caractérisation des différents fragments

La synthèse chimique en phase solide a connu un essor considérable, notamment avec la découverte de la chimie combinatoire. Cette approche a été introduite par Merrifield en 1963 dans le cadre de la synthèse peptidique, elle repose sur un principe simple mais ingénieux qui consiste à immobiliser un des réactifs sur un polymère insoluble, permettant ainsi d'utiliser de larges excès de l'autre réactif sans problème d'élimination en fin de réaction. Le plus grand avantage de cette technique, est que le composé intermédiaire d'intérêt reste fixé sur la phase solide, après chaque rinçage, ce qui supprime les étapes de purification. Dans le cadre de notre étude, Les peptides sont synthétisés chimiquement selon la stratégie Fmoc. La méthode Fmoc est basée sur l'utilisation de groupements protecteurs orthogonaux, tels que le groupement base-labile N-Fmoc pour protéger les groupements amine (NH), et des groupements dits permanents, protecteurs des chaînes latérales (voir résumé tableau II.1.3.1).

Amino acides	Fmoc
Asparagine	Trt, Tmob
Aspartate	t-Bu
Arginine	Mtr, Pmc, Pbf
Cystéine	Acm
Glutamine	Trt, Tmob
Glutamate	t-Bu
Histidine	Trt
Lysine	Boc
Méthionine	Non protégé
Serine	t-Bu
Thréonine	t-Bu
Tryptophane	Boc
Tyrosine	t-Bu

Tableau II.1.3.1. : Groupements protecteurs dits « permanents » des chaînes latérales des acides aminés. Durant la croissance des chaînes peptidique par synthèse chimique en phase solide, les groupements protecteurs permettent de réduire les associations latérales (liées aux chaînes), les elongations incontrôlables (principalement au niveau des fonctions NH/COOH) et les réactions parasites, qui nuisent à l'obtention du peptide ou de la protéine désirée.

II.1.3.1 Cycle de synthèse peptidique

La synthèse de peptides consiste en une répétition d'étapes de déprotection, d'activation et de couplages, jusqu'à l'obtention du peptide désiré, qui est ensuite séparé du support par coupure chimique, puis purifié et analysé.

II.1.3.1.1. Chargement de la résine

L'initiation de la synthèse peptidique nécessite la fixation du premier acide aminé au support qui est une résine solide Wang présentant à sa surface un linker HMP via son extrémité C-terminale par une liaison ester (Figure II.1.3.1.1.1) ou amide selon la nature du groupement C-terminal du premier acide aminé. A la fin du couplage les groupements hydroxyle du HMP n'ayant pas réagi, sont protégés par l'anhydride acétique.

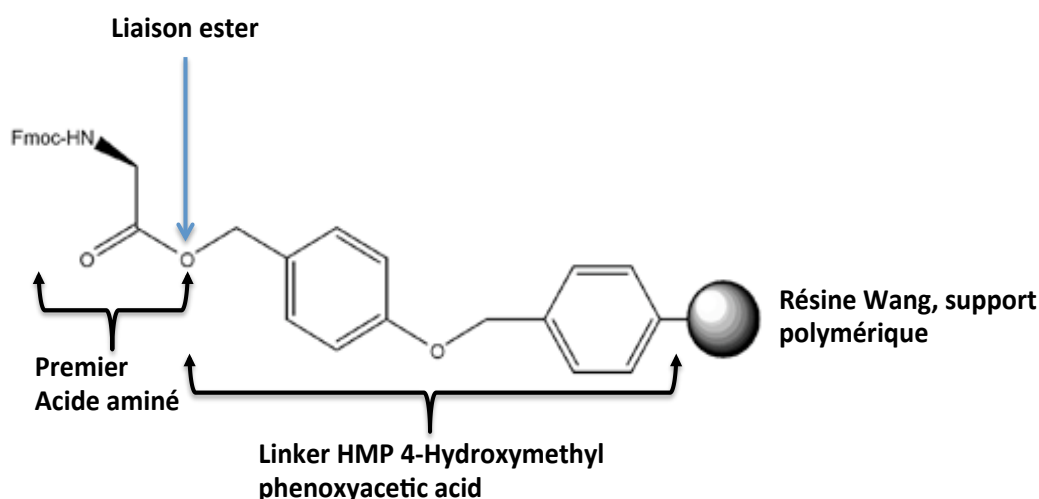


Figure II.1.3.1.1.1: Fixation du 1^{er} acide aminé sur le support insoluble et inerte par une liaison ester via son groupement carboxylique.

II.1.3.1.2. Déprotection de la fonction alpha amine

La protection Fmoc du groupement N-terminal est éliminée suivant le mécanisme décrit dans la Figure II.1.3.1.2.1, à l'aide d'un court traitement par une base faible, 20% de pipéridine en présence de 80% de NMP, solvant apolaire qui favorise la solubilisation et le gonflement de la résine Wang HMP, permettant d'isoler les différentes chaînes peptidiques, rendant difficile la formation des liaisons hydrogènes responsables de l'enfouissement de la

fonction NH. Au cours de cette étape la résine est lavée avec la NMP et l'ensemble est soumis à une analyse d'absorption à 301 nm, longueur d'onde d'absorbance du dibenzofulvene-piperidine. Ainsi on peut suivre la fixation des acides aminés sur l'oligopeptide lors du cycle de synthèse. Une forte diminution de l'absorbance, résulte d'une fixation incomplète des acides aminés lors du cycle précédent.

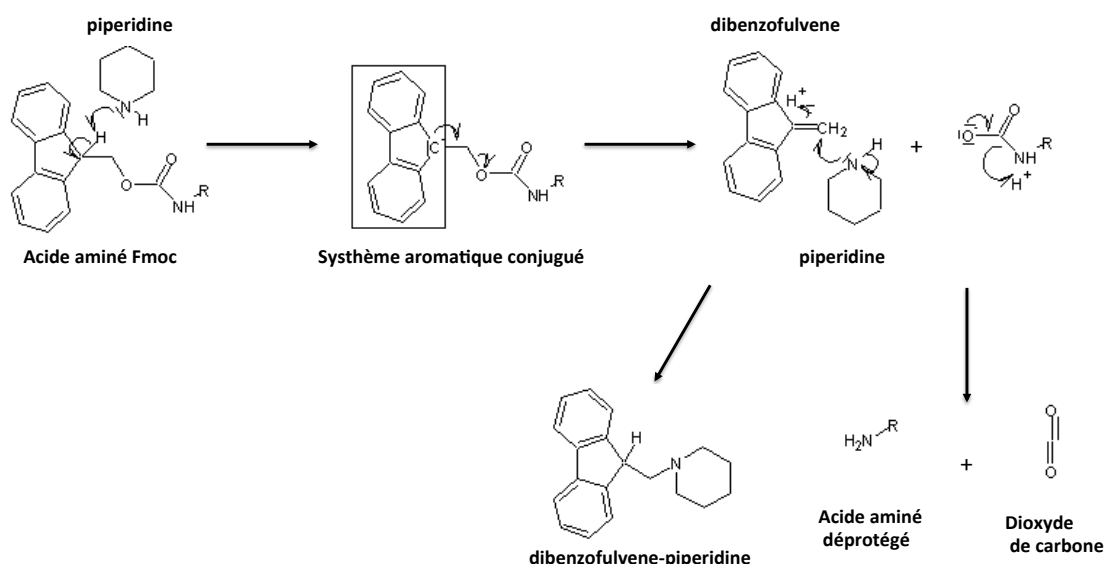


Figure II.1.3.1.2.1: Mécanisme réactionnel d'élimination du groupement Fmoc par la piperidine.

La déprotection du groupement alpha N-terminal est initiée par une interaction (attaque nucléophile) entre la piperidine et le Fmoc conduisant à la conversion du Fmoc en dibenzofulvène et à la libération d'un acide aminé libre et de dioxyde carbone. Le dibenzofulvène peut ensuite réagir avec de la piperidine en excès pour former le dibenzofulvène-piperidine.

II.1.3.1.3. Activation du groupement alpha carboxylique

L'activation de l'acide aminé en solution avec le NMP via son groupement carboxyle pour la formation de liaisons amide est rendue possible par l'utilisation des réactifs de couplage HOBt/DCC (1M/1M). Le peptide subit au contact de ces derniers une transformation dont le résultat conduit à la production d'ester d'acide aminé HOBt actif et de DCU, selon le mécanisme décrit dans la Figure II.1.3.1.3.1.

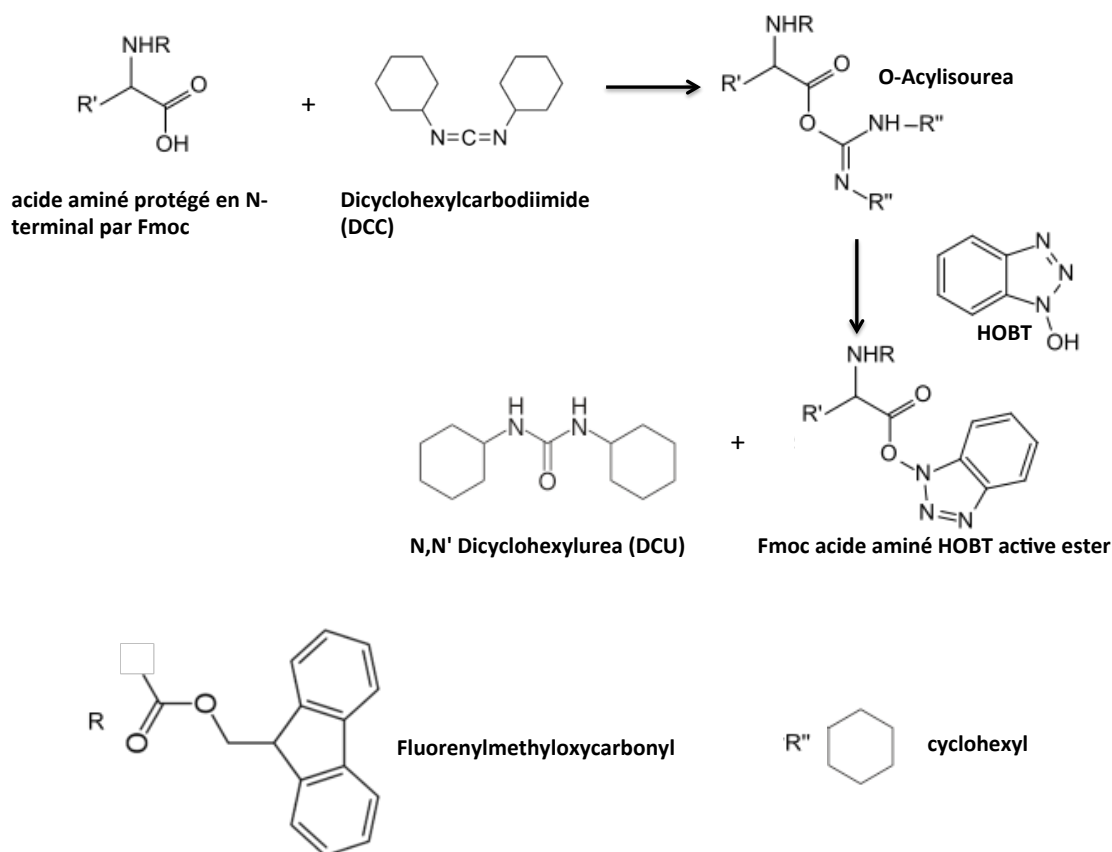


Figure II.1.3.1.3.1: Mécanisme réactionnel d'activation du groupement alpha carboxylique des acides aminés, nécessaire pour l'élongation de la chaîne peptidique-Résine Wang. Au cours de cette étape d'activation, l'acide aminé est solubilisé par la NMP puis par 1 mL de HOBT à 1M dans la NMP, cette solution est alors transférée dans l'activateur où 1mL de DCC à 1M dans la NMP est ajouté.

II.1.3.1.4. Couplage des acides aminés

Cette étape est initiée par le passage du mélange contenant l'ester d'acide aminé HOBT actif (environ 2,5 à 10 fois la capacité de la résine) vers le réacteur, pour la formation d'une liaison peptidique entre le groupe carboxyle (COOH) de l'acide aminé injecté et la fonction NH libre de la chaîne peptidique en élongation sur la résine, selon le mécanisme décrit dans la Figure II.1.3.1.4.1. Le milieu de réaction est ensuite débarrassé des molécules en excès non accrochés par un lavage (excès NMP). Le temps nécessaire à une acylation complète dépend de la nature du résidu activé, de la séquence peptidique liée à la résine et de la concentration des réactifs.

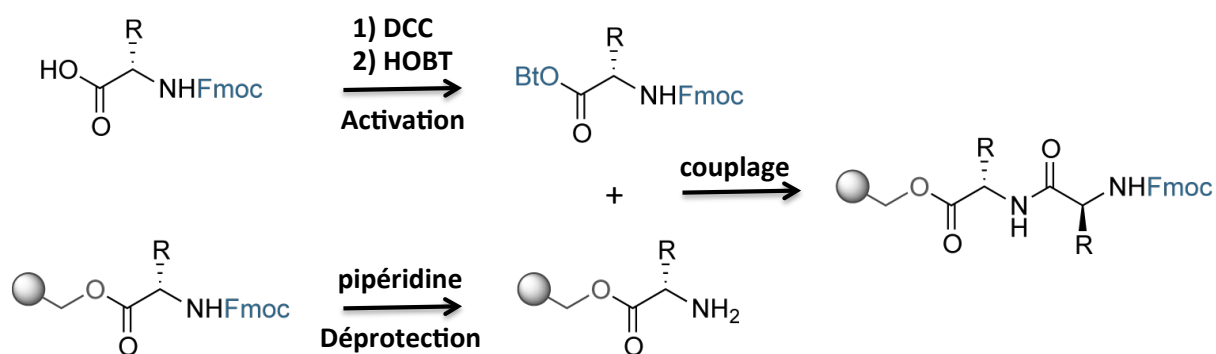


Figure II.1.3.1.4.1: Schéma représentatif du processus de couplage induisant à l'elongation de la chaîne peptidique.

Pour l'ensemble des peptides issus de la maturation tryptique de VP7 l'elongation de la chaîne polypeptidique se fait automatiquement avec une durée d'une heure par cycle, selon un programme préalablement établi, sur un synthétiseur de peptides Applied Biosystems 431A.

II.1.3.2 Clivage de la résine et déprotection des chaînes latérales

Cette étape dure 3 heures et s'effectue sous la hotte. Le clivage du peptide de la résine Wang se fait par addition de 2 ml d'un mélange réactionnel acide, contenant :

- 94% d'acide trifluoroacétique (TFA) concentré, acide fort important pour la séparation du peptide de la résine Wang HMP et le clivage du t-But lié aux chaînes latérales,
 - 2.5% H₂O ayant un rôle de scavenger chargé de bloquer les radicaux libres et empêcher les réactions indésirables,
 - 1% de Tis
 - 2.5% d' EDT.
- A la fin de cette étape, le mélange réactionnel est filtré pour éliminer la résine insoluble. L'oligopeptide soluble est par la suite précipité dans quatre falcons contenant 15 ml d'éther froid. Les falcons sont centrifugés durant 10 minutes à 3500 trs/mn à 0°C. Cette opération est effectuée trois fois, pour éliminer la suspension contaminée et garder uniquement le précipité contenant le peptide d'intérêt et les fractions d'impureté. Les culots

sont ensuite transférés dans un des falcons puis lyophilisés. La masse du produit brut est déterminée à la fin de la lyophilisation avant de purifier les oligopeptides par HPLC.

II.1.3.3 Purification des peptides par HPLC semi-préparative et analytique

Les produits obtenus à la fin de la synthèse sont purifiés par HPLC. On solubilise 40 mg de peptide lyophilisé dans un mélange d'eau (12 ml) et d'acétonitrile (3mL), puis on effectue une filtration de ce mélange à l'aide d'une seringue équipé d'un filtre, afin éliminer les particules solides qui pourraient boucher la colonne de chromatographie. Dans un premier temps, on réalise une analyse d'élution par HPLC analytique. Pour cela on introduit quelques gouttes de solution dans un vial que l'on place dans l'un des puits, puis on paramètre la méthode qui sera utilisée pour purifier les différents fragments peptidiques de VP7. En utilisant un gradient croissant d'acétonitrile (0% à 100% en 30 mn), on définit ainsi après analyse des profils d'élution préalablement établis pour chaque peptide, les conditions et les gradients utilisés pour l'élution par HPLC semi-préparative. La purification par HPLC semi-préparative s'effectue par injection de 4 ml de solution dans la boucle d'injection, qui permet de transférer le produit vers la colonne de séparation. Les gradients utilisés sont fonction de la séquence de chaque peptide. Finalement, nous estimons la qualité des fractions à l'aide d'une analyse par HPLC analytique de façon à recenser les fractions pures, que l'on collectera dans des ballons pour être lyophilisées postérieurement, afin d'éliminer les traces d'acétonitrile et d'eau. Une analyse par spectrométrie de masse est effectuée dans le but de confirmer la présence du produit et déterminer avec une grande précision le poids moléculaire attendu de chaque peptide.

II.1.3.4 Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF en mode réflecteur positif

La spectrométrie de masse MALDI-TOF (Désorption Ionisation Laser Assistée par Matrice à Temps de Vol) est souvent utilisée pour sa rapidité d'analyse, sa bonne tolérance aux sels et pour sa grande sensibilité car capable de détecter des quantités subfemtomolaires. La désorption laser a été utilisée dès 1976, à partir d'échantillons solides pour produire des peptides intacts, de masse ≤ 1000 Da, en phase gazeuse pour une analyse par spectrométrie de masse²²⁴. Mais ce n'est qu'à la fin des années 80 que la désorption ionisation laser assistée par matrice a été développée.

L'analyse des échantillons par spectrométrie de masse MALDI s'effectue en différentes étapes. Tout d'abord le polypeptide sec (analyte) est solubilisé dans une solution composée de

30% d'acétonitrile et de 70% d'eau à laquelle on ajoute en forte concentration un acide (*trans*-cinnamique ou du 2,5-dihydroxybenzoïc) qui absorbe dans l'ultra-violet grâce à son cycle aromatique. L'échantillon est ainsi placé dans la chambre hermétique, au bout de la sonde sur la cible, puis le vide est effectué dans le compartiment, ce qui permet la vaporisation partielle du liquide et sa fixation sur la matrice. Par la suite, un rayon laser à azote d'une longueur d'onde de 337 nm (dans l'ultra-violet) excite les acides. Les molécules de la matrice absorbent l'énergie transmise par le laser sous forme de photons UV, ce qui conduit à leur excitation et leur ionisation. L'énergie absorbée par la matrice provoque sa dissociation et son passage en phase gazeuse. Ainsi les molécules de matrice ionisées transfèrent leur charge aux polypeptides. La hausse de température, due au transfert d'énergie, et la basse pression accentuent la vaporisation du produit d'intérêt solubilisé (désorption) (Figure II.1.3.4.1). Le solvant non ionisé, est à cette étape éliminé en direction de la pompe à vide.

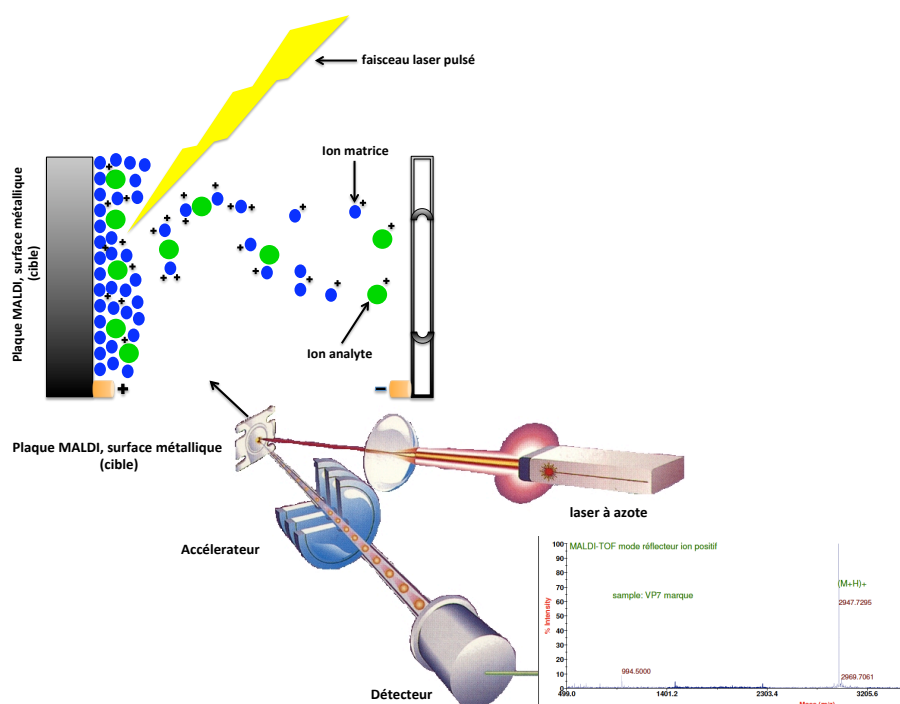


Figure II.1.3.4.1: Schéma de principe d'une source désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI, Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation). Le polypeptide (en vert) est co-cristallisé avec la matrice (en bleu).

Chaque polymère sous l'état gazeux est mono chargé (ou di-chargé) positivement, il est attiré vers l'anode, ce qui entraîne la propulsion des particules ionisées en direction du détecteur. Au cours de ce phénomène, les cations sont soumis à un champ électrique homogène, selon la formule d'Isaac Newton $a = F/m$. Donc pour une force F , homogène exercée par le champ électrique, plus la masse m est élevée, plus l'accélération de l'analyte est réduite, par conséquent plus la taille du peptide est élevée et plus le temps de vol est long. Il est important de noter que les polymères de poids moléculaires identiques atteindront le détecteur en même temps.

II.1.4. Préparation des vésicules larges unilamellaires

Le 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine ou DMPC possède une masse molaire de $677.933 \text{ g.mol}^{-1}$, une température de transition de phases T_m de 23°C , et une concentration micellaire critique de 6 nM . Le L- α -phosphatidylcholine ou EggPC, de masse molaire $770.123 \text{ g.mol}^{-1}$ et l'extrait total de foie ont été achetées chez Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama 35007-9105) sous forme de poudre lyophilisée. Les lipides ont été stockés à -20°C .

Pour la préparation des LUVs, les lipides ont été dans un premier temps solubilisés dans un mélange de méthanol/chloroforme (1/1 : $100 \mu\text{L}$). Le solvant organique a ensuite été évaporé à sec à l'aide d'un jet d'argon pendant cinq minutes pour former un film lipidique à la surface du tube en verre à bout arrondi, puis placé sous vide pendant 4 heures pour éliminer toute trace de méthanol et de chloroforme. Ce dernier a été réhydraté avec une solution de 6-Carboxyfluorescéine (6-CF) à 60 mM (solubilisée dans du PBS à 1 mM et à $\text{pH } 7.5$) et vortexé pendant plusieurs minutes, puis soumis à agitation à température supérieure à la T_m , 37°C , pendant 30 mn afin d'assurer une bonne dispersion des lipides et la formation des vésicules multilamellaires (MLV). La sonde fluorescente (6-CF. Figure II.1.4.1. A) utilisée possède un groupe carboxyle supplémentaire par rapport à la fluorescéine, rendant ainsi la molécule plus polaire et moins susceptible de traverser les membranes à $\text{pH} \geq 7.4$ (Figure II.1.4.1. B) à faible concentration en tampon phosphate²²⁵. Les vésicules unilamellaires ont ensuite été préparées à l'aide d'un appareil à extrusion (Avanti Mini-Extruder). La suspension de MLV a été passée sous pression dix fois de suite à travers des membranes filtrantes en polycarbonate dont la taille des pores était respectivement de 400 nm puis de 200 nm (Avanti Polar Lipids. Alabaster, Alabama 35007-9105). La 6-CF non encapsulée a été séparée des vésicules par chromatographie d'exclusion stérique en utilisant une colonne en verre de Sephadex G75 (Figure II.1.4.1. C)

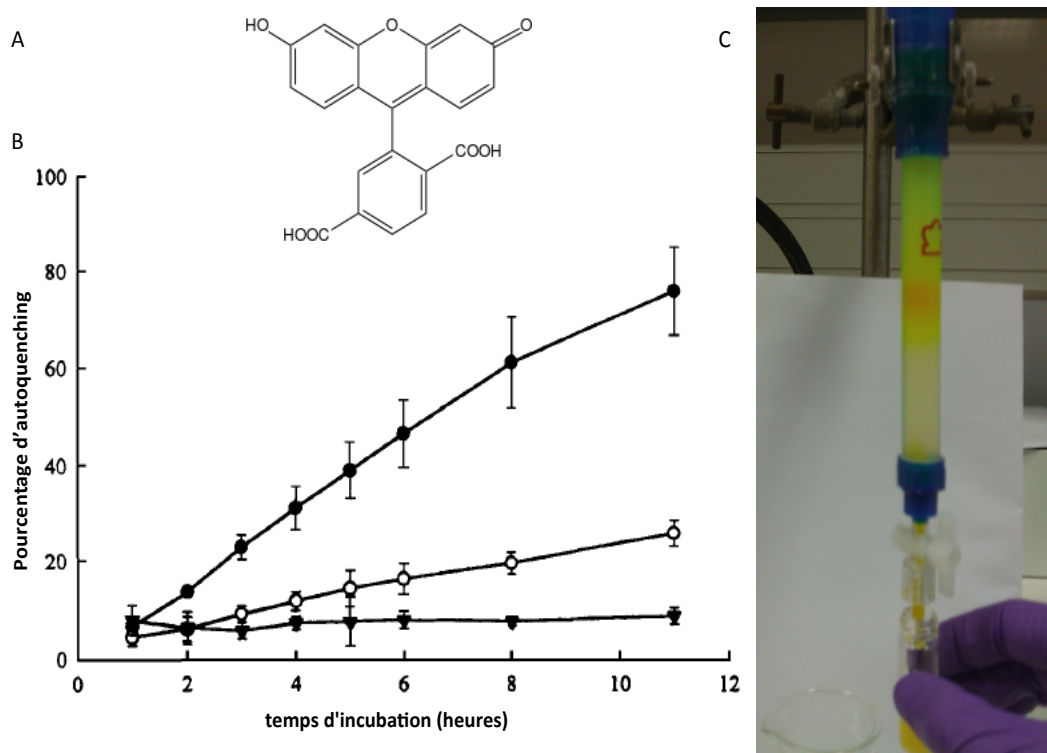


Figure II.1.4.1 : A. Formule chimique développée de la 6-Carboxyfluorescéine. B. Effet du pH sur la stabilité de la diffusion de la 6-Carboxyfluorescéine à 100 mM, à travers la membrane des liposomes d'Egg PC à 37°C, mis en évidence par Robert J. Lee et al en 1998.

Les courbes à cercles pleins, cercles vides et triangles pleins correspondent à la fuite spontanée de la 6-CF à travers la membrane des liposomes, mis en solution dans l'eau respectivement à pH 5, pH 6 et pH 7. C. Séparation de la 6-Carboxyfluorescéine non encapsulée des vésicules larges unilamellaires par chromatographie d'exclusion stérique, en utilisant une colonne en verre de Sephadex G75. Le volume final des vésicules larges unilamellaires récupérées à été évalué, afin d'estimer la concentration finale en liposomes.

II.1.4.1 Détermination de l'activité biologique

Interaction des peptides avec les vésicules larges unilamellaires (LUVs)

Afin de caractériser l'activité biologique des différents peptides résultants de la fragmentation trypsique du domaine C-terminal de la glycoprotéine VP7, nous avons utilisé une méthode standard, spécifique à l'étude de la destabilisation membranaire ou formation par des protéines^{226,227} et par des détergents^{228,229}. Cette méthode est également exploitée dans le domaine de la photochimie, cependant son application est plus compliquée, en raison de la formation d'espèces réactives dégradant la 6-CF. Le principe de la méthode est basé sur

l'utilisation des LUVs stables et non perméables, contenant une sonde fluorescente extrinsèque qui possède une grande stabilité et un haut rendement de fluorescence à pH > 7.5 dans le visible. Il s'agit de la 6-CF, ayant des propriétés d'autoquenching à concentrations supérieures à 50 mM. La méthode est schématisée sur la Figure II.1.4.1.1.

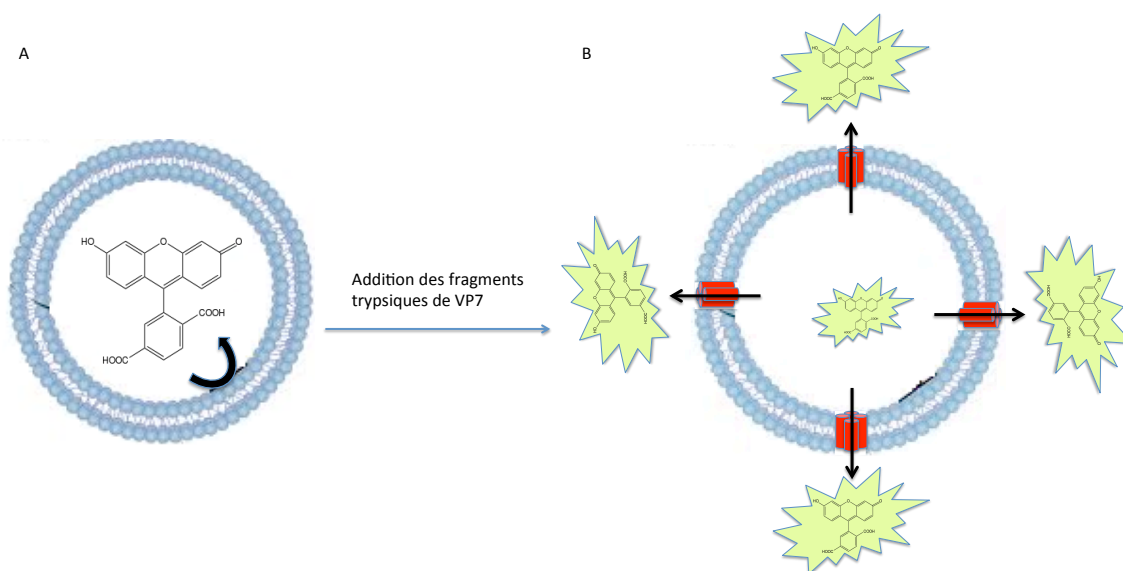


Figure II.1.4.1.1: Principe de mesure de la perméabilisation par la méthode de « dequenching » de la 6-CF, utilisée dans le but d'évaluer l'activité biologique des différents fragments tryptiques issus de la glycoprotéine VP7. A. Vésicules unilamellaires contenant des molécules de 6-CF à 60 mM, dont la fluorescence est annihilée par autoquenching. **B.** Libération et fluorescence des molécules de 6-CF, suite à la déstabilisation de la membrane des vésicules unilamellaires, induite par l'interaction des peptides avec les membranes.

Lorsque la 6-CF est concentrée dans le compartiment interne des LUVs, son intensité de fluorescence est très faible puisque le confinement des molécules dans la lumière des LUVs entraîne leur auto-atténuation « autoquenching ». Cependant, lors de l'addition des différents peptides à concentrations décroissantes dans la cuve de mesure, dont le volume final est de 1 ml, l'interaction des peptides avec les membranes modèles induit leur déstabilisation et deviennent perméables laissant échapper les molécules de 6-CF qui se diluent dans le volume externe conduisant à une augmentation nette de leur fluorescence suivie dans le temps (F_t). A la fin de chaque mesure, 10 μ L de 10% Triton X-100 sont ajoutés dans la cuve. L'intensité de fluorescence obtenue correspondant à la libération de toutes molécules de 6-CF et est utilisée comme le 100% pour la normalisation des courbes (F_f). Le pourcentage de fuite de la 6-CF (L_t) est calculé selon l'équation 1

$$L_t = \frac{(F_t - F_0)}{(F_f - F_0)} * 100 \quad Eq\ 1$$

F_0 est l'intensité de fluorescence au temps $t=0$.

Un spectre de référence représentant l'effet et la lyse des liposomes par le triton 100X est illustré dans la Figure II.1.4.1.2.

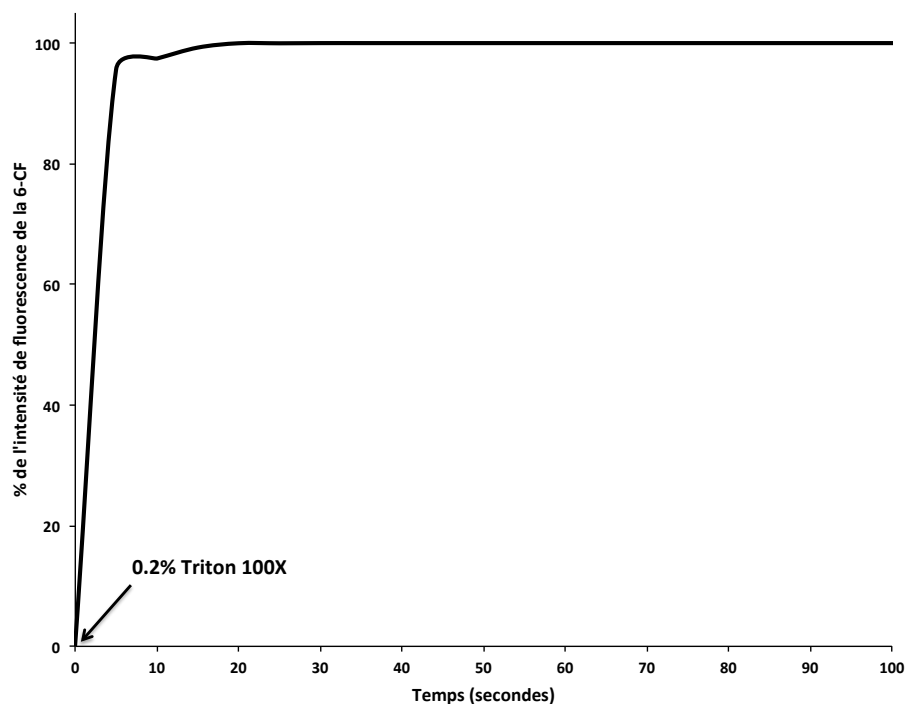


Figure II.1.4.1.2 : Spectre de référence montrant l'effet de l'addition de 0.2% de Triton 100X sur la lyse des vésicules unilamellaires d'Egg PC. Cela se traduit par une nette augmentation de la fluorescence de la 6-CF.

Remarque : Les volumes de solution peptidique utilisés dans ces expériences, ont été prélevés à partir d'une solution mère de 1 mM de peptide solubilisé dans le DMSO, afin d'obtenir une concentration finale variant de 1 μ M à 7.5 nM.

Les longueurs d'ondes, d'excitation et d'émission déterminées expérimentalement sont respectivement de 491 nm et 516 nm et correspondent au maximum d'absorption et d'émission de la 6-CF tel qu'indiqué dans la Figure II.1.4.1.3.

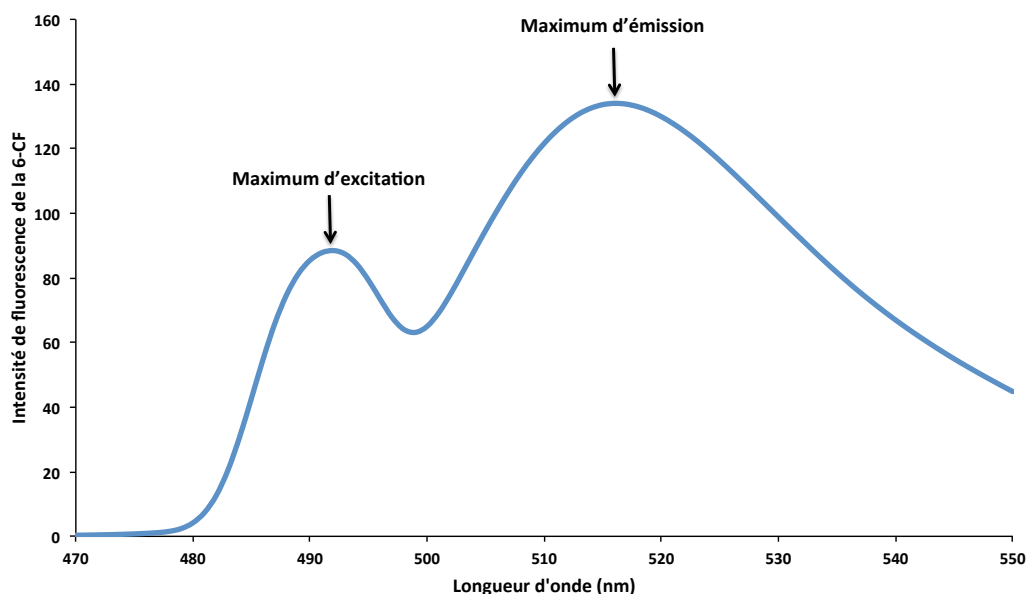


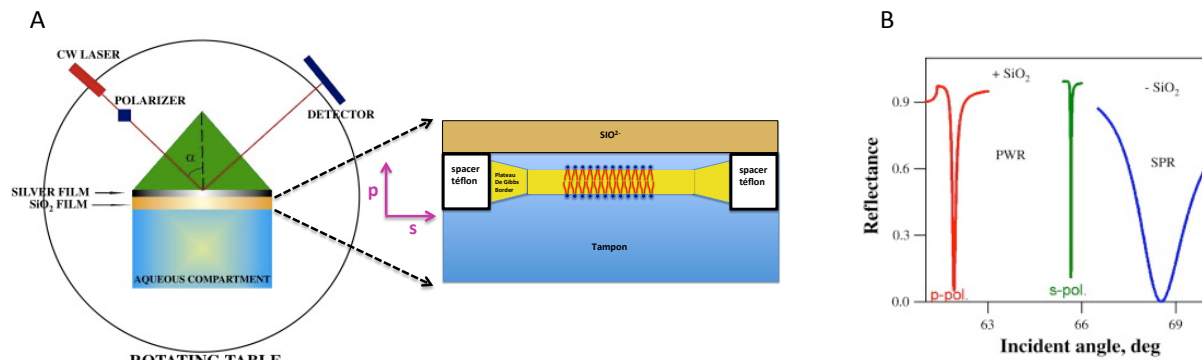
Figure II.1.4.1.3 : Spectre d'émission de la 6-CF à 60 mM en tampon PBS à 1 mM, en présence de vésicules lipidiques d'extrait cellulaire total de foie bovin ; $\lambda_{emi} = 517\text{ nm}$ et $\lambda_{exc} = 492\text{ nm}$.

II.1.5. Etude par PWR de l'interaction des peptides avec des bicouches

II.1.5.1 Principe de la PWR

La spectroscopie de résonance plasmonique aux ondes guidées (PWR) est fondée sur le couplage de la résonance de plasmon d'une mince surface métallique d'argent avec l'onde dirigée d'une couche diélectrique de silice qui couvre le métal. Ce couplage découle de l'excitation du nuage électronique du métal (Ag) par une lumière monochromatique provenant d'un faisceau laser He-Ne incident sur un prisme support de la couche métallique. Cette dernière enveloppée d'une couche diélectrique de silice, placée en contact du compartiment aqueux fonctionne comme un guide d'onde²³⁰ générant une onde évanescente, sensible aux propriétés optiques des dépôts biologiques situés à proximité de la surface du prisme, qui se propage au delà de la couche de silice²³¹ (Figure II.1.5.1.1. A). Il est important de noter que l'intensité du champ électrique généré par cette onde est fonction de la distance entre la surface de la silice et le milieu d'émergence. Les propriétés de cette onde électromagnétique serviront donc à caractériser les assemblages moléculaire et les interactions avec la membrane immobilisée sur la couche diélectrique. En effet, les ondes

évanescences générées par la lumière p-polarisée et s-polarisée caractérisent respectivement les propriétés optiques perpendiculairement et parallèlement au plan de la bicouche immobilisée en surface. Les modifications de la densité en masse, dues à l'addition ou à l'élimination de masse de la membrane, causent des déplacements de même position et amplitude des deux composantes de la lumière, on parle donc de changements isotropiques alors que des altérations en structure vont causer des changements anisotropiques.



II.1.5.2 Avantage de la PWR

Contrairement à la technique classique de résonance plasmonique de surface (SPR), la PWR apporte des avantages dont les principaux sont :

- Une augmentation de la résolution et de la sensibilité associée à l'amplification des intensités électromagnétiques au niveau de la surface diélectrique,
- L'excitation de la résonance pour les deux polarisations *s* et *p* de l'onde incidente (Figure II.1.5.1.1. B). Cela permet de mesurer l'anisotropie de l'indice de réfraction et du coefficient d'absorption du film déposé à la surface du cristal.
- Le dépôt de la couche de silice sert d'adhésion mécanique et chimique pour le film métallique.

Cette méthode nous permet de déterminer les angles de résonance, la largeur des spectres et la profondeur des spectres, qui sont directement associés à l'indice de réfraction, à l'épaisseur des couches disposées à l'interface et au coefficient d'extinction à la longueur d'onde utilisée.

II.1.5.3 Application à l'étude d'interaction peptides-membranes

Afin de déterminer les constantes de dissociation apparettes et l'effet des peptides dérivés de la maturation de la glycoprotéine VP7, interagissant avec les membrane d'Egg PC immobilisées, nous avons exploité les propriétés des ondes évanescentes générées par la lumière *p*-polarisée et *s*-polarisée. L'utilisation des deux propriétés optiques (polarisations) perpendiculaire et parallèle au plan d'incidence, le plan de la bicouche d'Egg PC, *s* et *p*, nous permet de mettre en évidence sans utilisation de molécules marquées ou fluorescentes, les changements isotropiques, qui se traduisent par des déplacements de même position et amplitude des deux composantes de la lumière, Δ_s et Δ_p . Ces modifications peuvent être causées par les changements en masse, Δ_m , dues à l'addition ou l'élimination de molécules et/ou à des changements anisotropiques relatifs aux altérations en structure Δ_{str} , qui se traduisent par les déplacements de l'angle d'incidence pour les deux composantes de la lumière (Δ_s et Δ_p) dans deux directions opposées.

Cette technique répond aux conditions d'études des interactions protéine-protéine, protéine-ligand et protéine-lipide en permettant de distinguer en temps réel les changements. Dans le cadre de nos expériences les résultats obtenus ont été analysés à trois niveaux :

- L'évaluation des constantes d'affinité K_d , des différents peptides issus de la maturation de la glycoprotéine VP7 pour la membrane d'Egg PC
- L'analyse graphique²³² des déplacements d'angles de résonance des polarisations *s* et *p* lors de l'interaction des peptides avec la bicouche lipidique sont transférés d'une coordonnée *s-p* à une masse-structure (Figure II.1.5.3.1),et permettent ainsi de déterminer les changements en masse et en structure dues aux interactions protéines-lipides.

- Un modèle mathématique basé sur les fonctions de Maxwell permet d'ajuster les courbes réflectance-angle d'incidence expérimentales pour en extraire des informations sur l'indice de réfraction, le coefficient d'extinction et l'épaisseur des couches à la surface résonante.

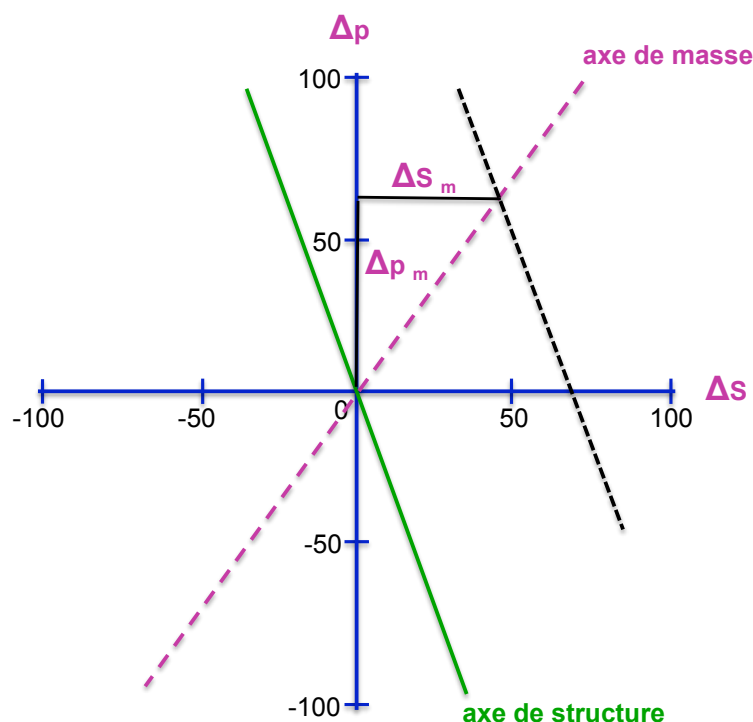


Figure II.1.5.3.1 : Analyse graphique des changements en masse et en structure des couches à l'interface du prisme (Salamon et Tollin. 2004)

II.1.6. Dichroïsme circulaire, technique spectroscopique utilisée pour la détection des structures secondaires

II.1.6.1 Historique

Pratiquement tous les produits naturels, acide nucléiques, protéines, etc, manifestent une activité optique. Elle fut observée pour la première fois en 1811 par François Arago, dans une expérience sur le cristal de roche. La lame de cristal de roche coupée perpendiculairement à l'axe optique, est placée entre un polariseur et un analyseur. Il a alors observé un spectre de lumière colorée qui évolue lorsque il tourne le polariseur ou l'analyseur. Puis en 1812, le pionnier de l'utilisation de la lumière polarisée pour l'étude des solutions, Jean-Baptiste Biot, a proposé que le plan de la polarisation des rayons lumineux subit une rotation (pouvoir

rotatoire) qui n'est pas aussi rapide pour les différentes couleurs des rayons lumineux (dispersion rotatoire) et que certains cristaux dévient le plan de polarisation de la lumière vers la droite et d'autres vers la gauche. Jean-Baptiste Biot a mentionné dans son *mémoire sur les rotations que certaines substances impriment aux axes de polarisation des rayons lumineux*²³³, l'activité optique de la façon suivante:

« Cette propriété consiste dans la faculté qu'ont les molécules dont il s'agit, de faire tourner d'un certain angle et dans un certain sens, les axes de polarisation des rayons lumineux ».

En 1815, il a généralisé cette expérience aux solutions liquides telles que le sucre de canne, le camphre ou encore l'essence. En 1822, Augustin Fresnel²³⁴ a introduit la notion de polarisation circulaire et a expliqué dans son mémoire sur la double réfraction, qu'il est possible de décomposer la polarisation linéaire de la lumière, en deux ondes polarisées circulaires gauche et droite et que leurs vitesses de propagation sont différentes dans les milieux doués d'activité optique, ce qui se traduit par des indices de réfraction différents. En 1895 Aimé Cotton a réalisé pour la première fois des expériences de dichroïsme circulaire en se basant sur l'interprétation de Fresnel et il a pu observer des variations d'intensité lumineuse sur la lumière polarisée circulaire gauche et droite à travers un liquide actif. Mais ce n'est qu'en 1848, que Louis Pasteur a fourni une démonstration du lien entre activité optique et structure moléculaire grâce aux expériences effectuées sur les sels de tartrate. Il a écrit à ce propos un mémoire en 1848²³⁵ intitulé «Mémoire sur la relation qui peut exister entre la forme cristalline et la composition chimique et sur la cause de la polarisation rotatoire».

II.1.6.2 Principe général

L'interaction de l'onde polarisée circulaire gauche ou droite avec des molécules chirales donne lieu à des phénomènes connus sous le nom général d'activité optique. Ainsi ces ondes en traversant cet échantillon chiral, ne sont pas absorbées à l'identique. Cette différence d'absorption $\Delta A = A_G - A_D$, où A_G représente l'absorbance pour la lumière polarisée gauche et A_D représente l'absorbance pour la lumière polarisée droite, nous permet de définir le dichroïsme circulaire $\Delta \epsilon$, qui vaut

$$\Delta \epsilon = \epsilon_{\text{gauche}} - \epsilon_{\text{droite}} \quad Eq\ 2$$

où $\varepsilon_{\text{gauche}}$ et $\varepsilon_{\text{droite}}$ sont les coefficients extinctions molaires en $\text{mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ du milieu pour les deux directions de polarisation de la lumière.

La loi de Beer Lambert nous donne,

$$A = L * \varepsilon * C_{\text{mol}} \quad \text{Eq 3}$$

A absorbance, C_{mol} concentration molaire en mol L^{-1} , L longueur de la cuve en cm

On en déduit donc que :

$$\Delta\varepsilon = \frac{\Delta A}{L * C_{\text{mol}}} \quad \text{Eq 4}$$

Le dichroïsme circulaire est également accessible via une mesure de l'ellipticité molaire correspondant alors à $[\theta] = 3300 (\varepsilon_G - \varepsilon_D)$ en $\text{degrés.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$.

La mesure du dichroïsme circulaire est effectuée, en plaçant un échantillon dans un faisceau dont la polarisation est alternativement gauche et droite. L'intensité lumineuse varie périodiquement et l'amplitude de cette variation permet de déterminer ΔA . On obtient ainsi des courbes en fonction de la longueur d'onde. L'allure, les maxima et les minima de ces dernières donnent des informations sur la structure secondaire « dominante » dans un peptide ou une protéine, qui est une combinaison linéaire des contributions des structures secondaires pures (hélice α ou feuillet β) selon leur abondance dans la molécule considérée (protéine ou peptide). Il a été démontré que les spectres de dichroïsme circulaire enregistrés entre 180 et 260 nm, recouvrent la région où sont observées les absorptions des transitions $n \rightarrow \pi^*$ (centrée autour de 220 nm) et $\pi \rightarrow \pi^*$ (centrée autour de 190 nm) de la liaison peptidique et permettent de caractériser les structures secondaires²³⁶ (Figure II.1.6.2.1) de type α hélice, feuillet β , coude et autres.

Les spectres du dichroïsme circulaire réalisés à des longueurs d'ondes supérieures à 230 nm permettent de distinguer les contributions des acides aminés aromatiques et de mettre en évidence les changements d'environnement, caractéristiques des repliements tridimensionnels des protéines.

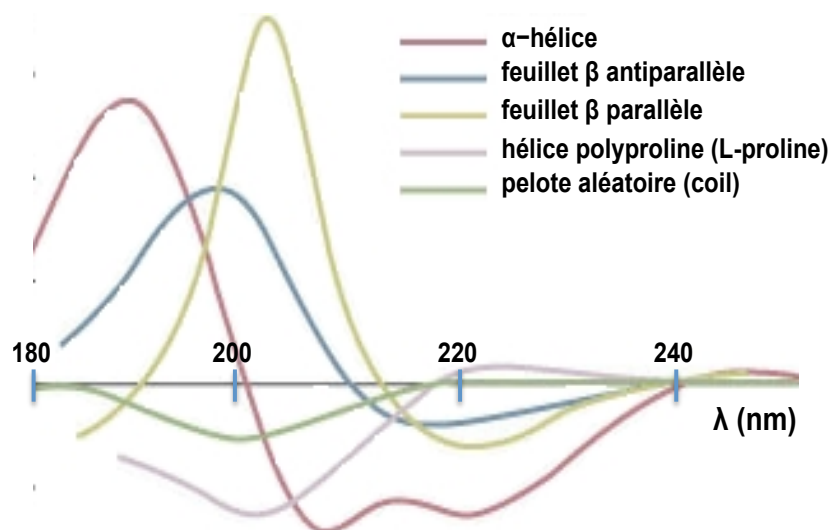


Figure II.1.6.2.1: *Courbes de Dichroïsme circulaire (CD) caractéristiques des structures secondaires observées dans les protéines.*

Dans le cadre de nos études, les spectres ont été enregistrés à l'aide d'un spectropolarimètre Jobin-Yvon model C8 et une cuve de 0.1 mm d'épaisseur a été utilisée. Les mesures ont été effectuées à température ambiante en présence de peptide dans des micelles de DPC à pH 3, dans des SUVs d'EggPC et d'extrait cellulaire total de foie, formées dans un tampon phosphate (1 mM phosphate, 0.15 mM de sodium azide, 93% H₂O et 7% D₂O à pH 7.4). Chaque spectre, résulte de la somme de cinq mesures successives et a été corrigé par soustraction de la ligne de base et lissé.

II.1.6.3 Préparation des micelles de dodecylphosphocholine (DPC)

La morphologie des agrégats lipidiques découle de la structure des tensioactifs. Dans le cas du DPC, compte tenu de la valeur du paramètre d'empilement (ρ) (tel décrit dans le Chapitre I: Introduction générale) et de concentration micellaire critique (CMC), égale à 1.1 mM, le système micellaire se forme spontanément, lorsque la concentration est supérieure à la CMC.

Dans le cadre de nos études, les micelles ont été préparées par solubilisation de 19.5 mg de DPC-d38 dans 500 μ L H₂O/D₂O (90% : 10%), permettant ainsi l'obtention d'une solution à 100 mM, dont la concentration finale est supérieure à la CMC. Seulement 9 μ L de cette solution ont été utilisés et le volume a été complété jusqu'à 300 μ L par addition d'eau, afin d'obtenir une solution finale de micelles à 3 mM.

II.1.6.4 Préparation des petites vésicules unilamellaires (SUV)

Pour la préparation SUVs, 1 mg lipides (extrait cellulaire total du foie ou Egg PC) ont été dans un premier temps solubilisés dans un mélange méthanol/chloroforme (1/1 : 50/50 μ L). Le solvant organique a ensuite été évaporé à sec à l'aide d'un jet d'argon pendant cinq minutes pour former un film lipidique à la surface du tube en verre à bout arrondi, puis mis sous vide pendant 2 heures pour éliminer toute trace de méthanol et de chloroforme. Ce dernier a ensuite été réhydraté avec 1 ml d'une solution de tampon PBS à 1 mM (à pH 7.4), vortexé pendant plusieurs minutes, puis soumis à agitation à température supérieure à la T_m pendant 30 mn afin d'assurer une bonne dispersion des lipides et la formation de vésicules larges multilamellaires (MLV). Les SUVs ont ensuite été préparées à l'aide d'un appareil à extrusion (Avanti Mini-Extruder) à partir d'une suspension de MLV qui a été passée sous pression dix fois à travers des membranes filtrantes en polycarbonate (Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama 35007-9105) dont la taille des pores était respectivement de 200 nm, puis de 100 nm puis de 30 nm.

II.1.7. Etude structurale par RMN et modélisation moléculaire

II.1.7.1 Historique

La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est une discipline relativement récente. Elle rend compte de la capacité de certains noyaux atomiques, possédant un spin, à absorber l'énergie des rayonnements puis la relâcher lors de la relaxation. La mise en évidence du spin par Otto Stern et Walther Gerlach à partir des expériences effectuées sur des atomes d'argent en février 1922, fut le début de l'histoire du phénomène de résonance. Ces expériences ont consisté à faire passer des atomes d'argent dans un champ magnétique non uniforme de direction verticale. Les atomes d'argent ayant un moment cinétique nul à l'état fondamental, son moment magnétique orbital associé est également nul. Ainsi, le faisceau ne devait pas subir l'influence du champ magnétique. Cependant, l'expérience montre la séparation du faisceau en deux composantes, ce résultat a été expliqué par l'introduction du moment cinétique de spin (spin). Dans le cas de l'atome d'argent, la séparation en deux faisceaux révèle l'existence de deux états possibles pour le spin (+1/2 et -1/2). En 1943 Stern est lauréat du prix Nobel de physique pour sa découverte du moment magnétique du proton. Mais le terme de résonance magnétique nucléaire fut introduit en 1938 par Isidor Isaac Rabi²³⁷, qui a montré qu'un champ magnétique oscillant pouvait induire des transitions entre les niveaux associés à l'état de spin de différents noyaux placés dans un champ magnétique statique. La

transposition de l'observation de Rabi, de la résonance magnétique nucléaire sur un faisceau de molécules indépendantes à des échantillons solides (paraffine) et liquides (eau) a été faite avec succès en 1945, indépendamment par Edward Mills Purcell²³⁸ et par Félix Bloch²³⁹. Bien que les travaux de Rabi portant sur la démonstration initiale de la RMN étaient cruciaux, le saut conceptuel et technique réalisé par Bloch et Purcell (1946) a ouvert de nouvelles perspectives pour la RMN moderne qui leur a valu le prix Nobel de physique en 1952. Cependant, ce n'est qu'en 1950 que la RMN devient un outil pour la chimie analytique suite à la découverte de Proctor et Yu²⁴⁰, qui ont montré que le déplacement chimique est fonction de l'environnement moléculaire. En 1951, J. T. Arnold et M. E. Packard étudièrent l'échange chimique entre deux populations de spins sur les spectres RMN et c'est seulement quelques années plus tard en 1963 que Forsén et Hoffman firent de la spectroscopie de transfert d'aimantation une méthode de référence pour l'étude des échanges de protons entre deux sites non-équivalents.

II.1.7.2 Les paramètres RMN définissant la structure d'une protéine

La structure d'une protéine peut être étudiée par RMN grâce à différents paramètres que sont dans le cadre de nos études, le déplacement chimique, l'effet Overhauser Nucléaire (NOE), le couplage scalaire entre spins et les liaisons hydrogènes.

II.1.7.2.1. Le déplacement chimique

Le déplacement chimique d'un proton d'une protéine dépend de son environnement électronique et est donc lié aux structures secondaires dans lesquelles il est engagé. Il peut être décomposé selon l'équation suivante²⁴¹.

$$\delta_{\text{protéine}} - \delta_{\text{randomcoil}} = \sum (\delta_{\text{rc}} + \delta_{\text{m}} + \delta_{\text{e}} + \delta_{\text{s}}) \quad \text{Eq 5}$$

$\delta_{\text{protéine}}$ représente le déplacement chimique du proton observé pour un acide aminé dans la protéine ; $\delta_{\text{randomcoil}}$ correspond au déplacement chimique moyen du proton du même acide aminé dans les structures en pelote statistique. Ce dernier est proche des déplacements chimiques rapportés par Wüthrich²⁴² ; δ_{rc} provient de la contribution des courants de cycle²⁴³ (tyrosine, phénylalanine et tryptophane dans le cas des protéines); δ_{m} représente l'anisotropie magnétique des liaisons peptidiques, due aux groupements carbonyles ; δ_{el} décrit la contribution de l'interaction électrostatique et δ_{s} symbolise la contribution du solvant.

Cette équation traduit la dépendance conformationnelle du déplacement chimique des protons des protéines. Selon la nature du proton considéré, les contributions dues à l'effet de la conformation sont plus ou moins importantes.

II.1.7.2.1.1 Les protons des chaînes latérales (non labiles)

Dans le cas des cycles aromatiques, l'effet du courant de cycle est plus prépondérant sur les protons des autres chaînes latérales, dès qu'ils sont proches du cycle.

Les électrons π sont plus polarisables que les électrons des liaisons σ . Leur circulation produit un champ secondaire relativement fort qui perturbe les noyaux voisins. Les électrons, de part et d'autre du plan du cycle, circulent en réaction au champ magnétique externe B_0 et génèrent ainsi un champ opposé au centre du cycle et un champ supplémentaire à l'extérieur du cycle. Au centre du cycle où le champ induit est opposé à B_0 , il y a blindage. A l'extérieur du cycle, où le champ induit s'additionne à B_0 , il y a déblindage (Figure II.1.7.2.1.1). De ce fait, tous les protons des chaînes latérales qui se trouvent proche des cycles des résidus tyrosine, phénylalanine, Histidine et tryptophane subiront l'effet du cycle, qui se traduit par des variations des déplacements chimiques (blindage ou déblindage).

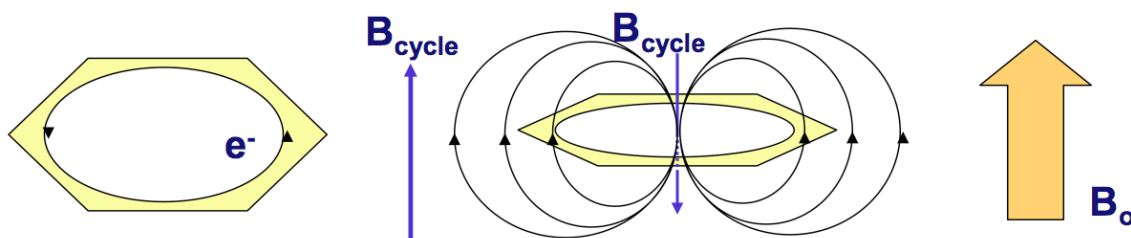


Figure II.1.7.2.1.1: Représentation des champs produits par les électrons de systèmes conjugués tels que les cycles aromatiques et leur effet sur les noyaux voisins.

II.1.7.2.1.2 Les proton H_α

Le déplacement chimique des protons H_α est lié à la structure secondaire dans laquelle ils se trouvent. Ce sont ceux pour lesquels le déplacement chimique est le moins influencé par la structure 3D²⁴⁴. Si ces protons sont proches d'un cycle aromatique, l'effet de ce dernier

compte pour la moitié dans leur déplacement chimique et la contribution des chaînes latérales pour les 30% restants²⁴¹.

II.1.7.2.1.3 Les protons amides

le déplacement chimique des protons amides est le plus difficile à simuler car outre la nature des chaînes latérales, l'effet du cycle, la contribution électrostatique au déplacement chimique est très importante.

II.1.7.2.2. L'effet Overhauser nucléaire (NOE)

L'effet NOE²⁴⁵ traduit la corrélation entre deux protons distants de moins de 5 angström, et constitue la principale information pouvant être exploitée pour l'élucidation de la structure d'une protéine. Les NOEs recueillis après analyse des expériences NOESY « Nuclear Overhauser Enhancement SpectroscopY », effectuées à faible temps de mélange, traduisent selon l'équation (Eq 6) la proximité spatiale des protons détectée par les changements d'intensité d'un pic. Plus la tâche de corrélation est intense, plus les protons peuvent être proches.

$$NOE_{ij}(\tau_{mol}) = \sigma_{ij} * \tau_m = \frac{K}{(r_{ij})^6} \quad Eq\ 6$$

σ_{ij} , représente le tenseur de relaxation entre deux protons i et j. τ_m représente temps de mélange de l'expérience NOESY.

Les intensités des taches de corrélation sont convertis par la suite en distances entre protons, en utilisant comme référence l'intensité du NOE impliquant les protons de distance connue qui servira, dès lors, de référence pour la conversion de l'ensemble des intensités NOEs en distances, grâce à la relation suivante :

$$\frac{r_{ij}}{r_{ij}^{ref}} = \left(\frac{NOE^{ref}}{NOE_{ij}} \right)^{1/6} \quad Eq\ 7$$

Dans le cas des expériences NOESY enregistrées à long temps de mélange, il se produit le phénomène de diffusion de spin et l'équation (Eq 6) n'est plus applicable. Le proton j va transférer l'aimantation issue du proton i sur un troisième proton qui lui est proche K. Le NOE entre i et j est diminué et il apparaît un NOE entre le proton i et K alors que ces deux protons sont éloignés. Ceci nous a conduit à réaliser des expériences NOESY à différents temps de mélange (de 100 ms à 250 ms) pour prendre en compte uniquement les NOEs

observés dans les expériences à faible et à temps de mélange plus élevé. Les NOEs recueillis lors de l'analyse des spectres peuvent être classés en trois catégories :

Les NOEs « intrarésiduels », les NOEs « séquentiels » entre les résidus i et $i+1$, permettant de déterminer l'ordre d'enchaînement des résidus dans la séquence. Les NOEs « moyenne distance » correspondent aux connections entre les protons de résidus séparés au plus trois résidus et fournissent des informations sur les structures locales secondaires^{246,247}.

II.1.7.2.3. Les liaisons hydrogènes

Les protons amides potentiellement impliqués dans des liaisons hydrogènes ont été mis en évidence grâce à leur échange lent, à l'échelle de la RMN, avec le solvant. Les échantillons sont préparés par lyophilisation du mélange de CD₃OH/CDCl₃ (1/1) ou l'eau non deutérée, utilisés pour la dissolution le peptide. Puis, le peptide est dissout à nouveau, respectivement dans un mélange de CD₃OD/CDCl₃ (1/1) ou dans D₂O. On observe alors, les résonances des protons labiles qui s'échangent plus ou moins rapidement, en fonction de leur accessibilité, avec le deutérium dans le spectre RMN. En effet, les protons ont une vitesse d'échange ralentie, soit parce qu'ils sont engagés dans une liaison hydrogène soit parce qu'ils sont difficilement accessibles au solvant en raison de leur position à l'intérieur de cavités au sein de la structure.

II.1.7.3 Acquisition et traitement des expériences RMN

Pour réaliser les expériences de RMN, les échantillons ont été préparés dans un volume de 500 μ L d'un mélange CD₃OH/CDCl₃ (1/1), utilisé pour mimer le milieu hydrophobe des membranes lipidiques^{248,249}, ou bien dans un mélange constitué de 90% H₂O et 10% de D₂O en présence de détergents micellaires tel que le dodécylphosphocholine (DPC) à 100 mM, couramment utilisés pour dissoudre les protéines membranaires²⁵⁰. 1 mM de peptide sont ajoutés dans chaque tube et le pH, pour les manipes dans le DPC, est ajusté à 3.0, par addition de DCl ou NaOD pour l'ensemble des peptides étudiés. Les échantillons sont homogénéisés puis transférés dans un tube RMN de 5 mm. Le pic d'eau est utilisé pour la calibration interne des déplacements chimiques. Les expériences de RMN sont enregistrées sur un spectromètre Avance Bruker qui opère à une fréquence de 600,14 MHz en proton. Les paramètres des différentes expériences à deux dimensions ¹H-¹H TOCSY, NOESY et COSY enregistrés sur chacun des échantillons sont décrits dans le tableau II.1.7.3.1. Avant l'acquisition, le signal de l'eau est supprimée à l'aide de séquences WATERGATE d'impulsions gradients (water suppression using excitation sculpting with gradients).

II.1.7.4 Stratégies d'attribution

Les expériences RMN à deux dimensions sont indispensables pour l'élaboration expérimentale de modèles structuraux et permettent l'obtention des paramètres décrits précédemment dans le paragraphe II.1.7.4.1.

Dans un premier temps il est important d'effectuer l'attribution des fréquences de résonance de l'ensemble des protons des peptides étudiés. Cette stratégie d'attribution commune repose sur l'identification et la classification des différents acides aminés d'après leurs systèmes de spin grâce aux couplages scalaires. Aux 20 acides aminés naturels correspondent quatre motifs pour les cycles aromatiques (Figure II.1.7.4.1. A). et 10 motifs de connexion différents pour les protons aliphatiques (Figure II.1.7.4.1. B).

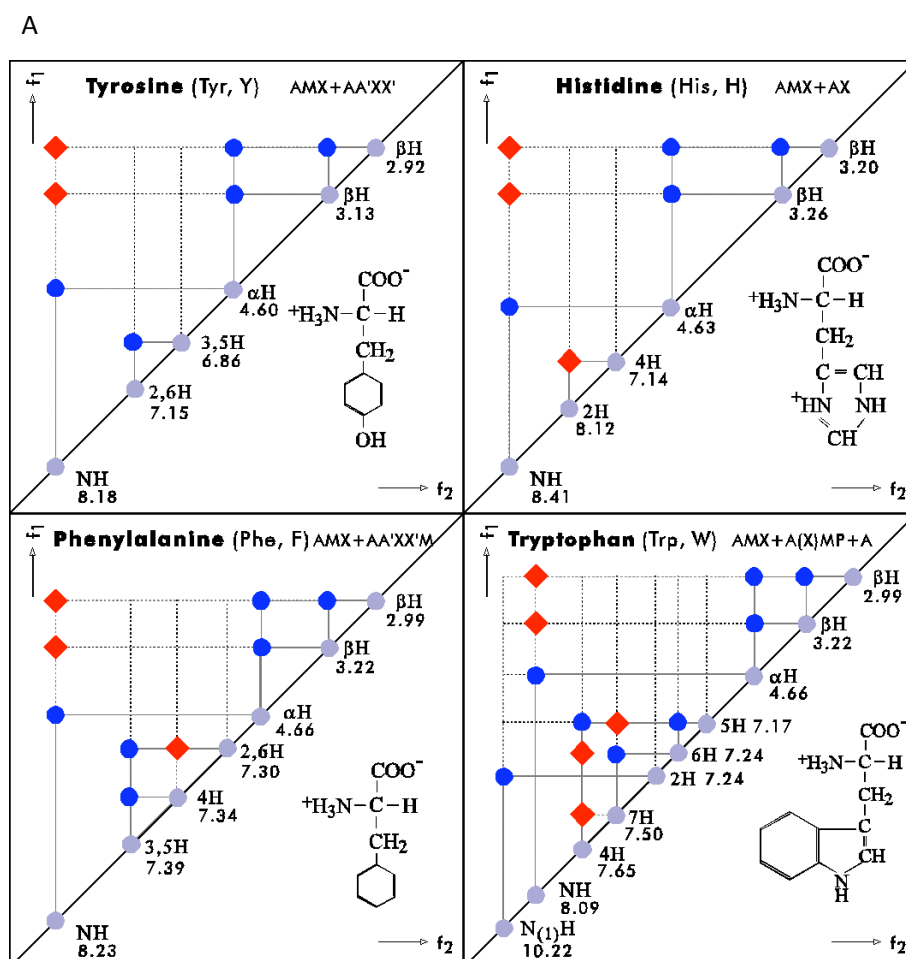


Figure II.1.7.4.1. A : Diagramme de connectivités, COSY, TOCSY pour les systèmes de spins non labiles des acides aminés aromatiques. Les cercles pleins gris, correspondent aux pics diagonaux, les bleus représentent les connectivités COSY et les losanges rouges les connectivités TOCSY.

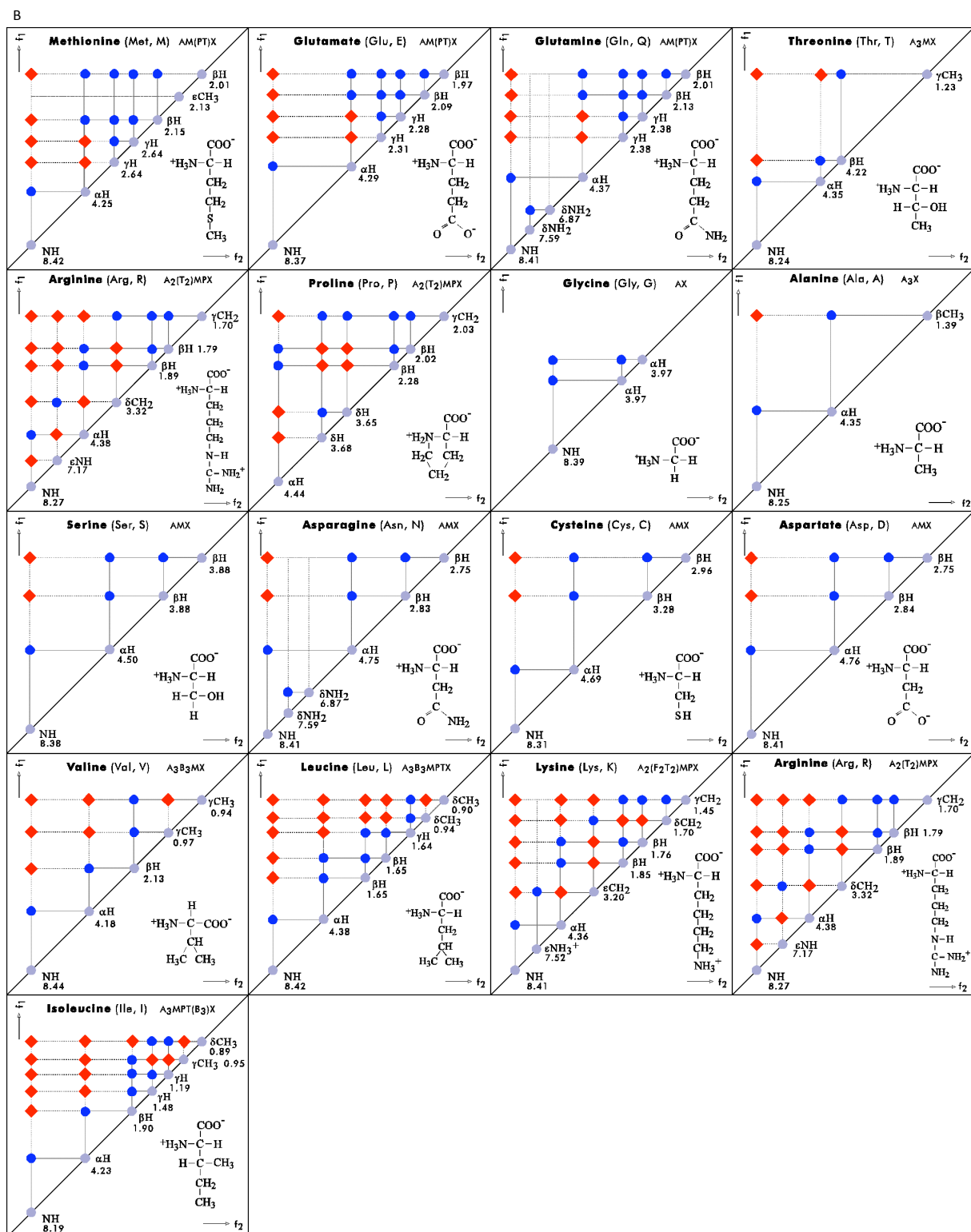


Figure II.1.7.4.1. B: Diagramme de connectivités, COSY, TOCSY pour les systèmes de spins non labiles des acides aminés non aromatiques. Les cercles pleins gris, correspondent aux pics diagonaux, les bleus représentent les connectivités COSY et les losanges rouges les connectivités TOCSY.

Le classement des acides aminés par système de spins constitue un code dégénéré, par conséquent, l'identification de la nature propre de l'acide aminé doit faire appel à d'autres critères tels que la valeur des déplacements chimiques ou bien la présence de corrélations dipolaires intrarésiduelles caractéristiques. Par exemple les NOE entre les protons du cycle aromatique et les protons $H\beta$ pour les acides aminés aromatiques et la place occupée dans la séquence par l'acide aminé peuvent constituer une aide. L'identification de ces systèmes de spins a été faite à l'aide des expériences TOCSY et COSY enregistrées sur les échantillons des différents peptides en solution dans H_2O en présence de DPC ou bien dans un mélange de $CD_3OH/CDCl_3$ (1/1). L'expérience TOCSY permet de mettre en évidence le couplage scalaire qui se produit entre tous les protons d'un même système de spin au travers des liaisons covalentes (Figure II.1.7.4.2. A). L'expérience COSY quant à elle permet de mettre en évidence le couplage scalaire qui se produit entre protons séparés par au plus 3 liaisons tels que cela se produit entre le proton NH et le proton $H\alpha$ d'un même résidu (Figure II.1.7.4.2. B).

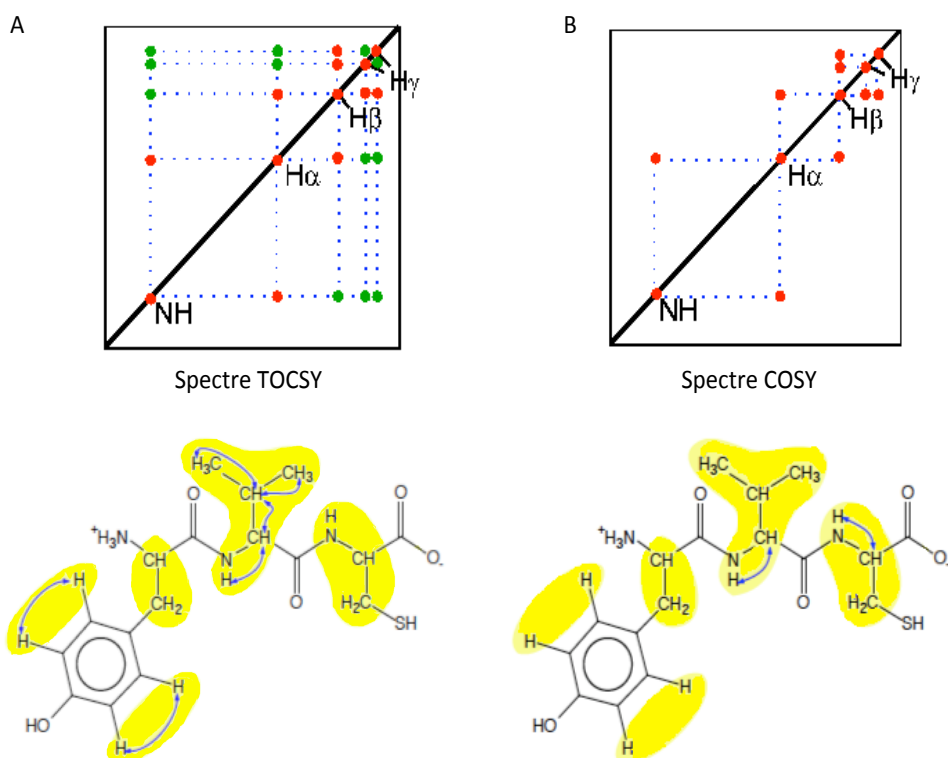


Figure II.1.7.4.2 : Stratégie d'identification des systèmes de spins à partir des spectres TOCSY (A) et COSY (B). A. Identification des systèmes de spins à partir des couplages scalaires J entre protons d'un même résidu. B. Spectre COSY permettant de mettre en évidence les couplages scalaires entre résidus séparés par au plus 3 liaisons comme dans le cas des protons NH et $H\alpha$ d'un même résidu.

Une fois l'identification des différents systèmes de spins terminée, on procède à l'attribution séquentielle qui consiste à replacer chaque système de spin dans la séquence afin de réaliser le « séquençage RMN » des peptides. Ce dernier est possible grâce aux corrélations dipolaires entre protons appartenant à des résidus voisins, proches les uns des autres à travers l'espace à une distance inférieure à 5 Å.

L'identification des corrélations spatiales qui existent entre protons de résidus proches, à partir des couplages dipolaires a été faite à l'aide des expériences NOESY. Ces expériences basées sur le couplage dipolaires, révèlent les corrélations séquentielles de type $H\alpha_{(i-1)}/NH_{(i)}$ et $NH_{(i)}/NH_{(i-1)}$ (Figure II.1.7.4.3) qui permettent de reconstituer l'enchaînement des systèmes de spins. Elles révèlent également les effets dipolaires à moyennes et longues portées caractérisant les structures secondaires et tertiaires des protéines comme décrit dans le tableau 3. En cas de difficultés lors de l'attribution, les NOEs séquentiels de type $H\beta(i-1)/NH(i)$ permettent de lever les ambiguïtés.

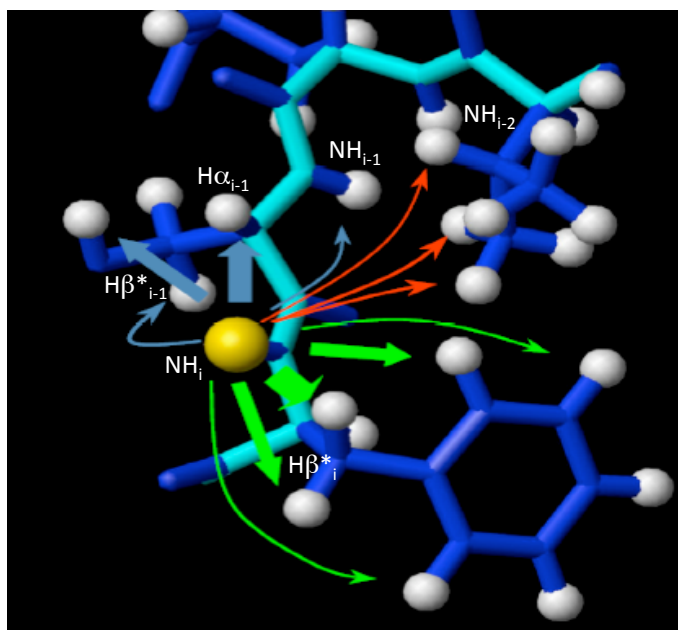


Figure II.1.7.4.3 : Les différents NOEs déterminés lors de l'analyse des spectres RMN 2D NOESY.

- ➡ Identification des systèmes de spin à partir des NOEs intrarésiduels.
- ➡ NOEs séquentiels permettent de déterminer l'ordre d'enchaînement des résidus dans la séquence
- ➡ NOEs moyenne ou longue portée entre protons de résidus éloignés. Les NOEs de type $N(i)N(i-2)$ sont caractéristiques des structures en hélice α ou de coudes.

Source: cours de Mastère 2, Eric Guittet.

II.1.7.5 Détermination des structures secondaires

Les structures secondaires se traduisent en RMN par des caractéristiques que l'on peut aisément mettre en évidence. En particulier des effets NOE entre proton $H\alpha$ et NH de résidus voisins, $\alpha N(i, i+1)$ sont caractéristiques de feuillet β , tandis que des effets NOE entre protons amides du squelette porté par des résidus voisins $NN(i, i+1)$ sont caractéristiques d'hélice α . Les distances sont en effet assez bien définies dans ces structures secondaires (respectivement 2.2 et 3.5 Å). Dans les structures en hélice α , on trouvera en plus des effets NOE entre les protons de résidus plus éloignés $\alpha N(i, i+2)$,

$NN(i, i+2)$, $\alpha N(i, i+3)$, $\alpha\beta(i, i+3)$ ou $\alpha N(i, i+4)$ (tableau II.1.7.5.1)

Distance	Hélice α	Hélice 3_{10}	Feuillet β parallèle	Feuillet β Anti-parallèle	Coude I	Coude II
$d\alpha N$	3.5	3.4	2.2	2.2	3.4	2.2
$d\alpha N(i, i+2)$	4.4	3.8			3.6	
$d\alpha N(i, i+3)$	3.4	3.3			3.1- 4.2	3.8- 4.7
$d\alpha N(i, i+4)$	4.2					
dNN	2.8	2.6	4.3	4.2	2.6	4.5
$dNN(i, i+2)$	4.2	4.1			2.4	2.4
$d\beta N$	2.5- 4.1	2.9- 4.4	3.2- 4.5	3.7- 4.7	2.9- 4.4	3.6- 4.6
$d\alpha\beta(i, i+3)$	2.5- 4.4	3.1- 5.1				

Tableau II.1.7.5.1: NOEs caractéristiques des structures secondaires (Wüthrich 1986).

II.1.7.6 Détermination des structures par le logiciel ARIA

Traditionnellement la mesure des NOEs est la première étape pour la détermination des structures tertiaires des macromolécules. ARIA est un logiciel de calcul qui exploite de nouveaux concepts, il permet d'attribuer les contraintes NOEs et de gérer les ambiguïtés obtenues au cours de l'attribution initiale. La notion d'ADR (Ambiguous Distance Restraint) a été introduite par Nilges en 1995²⁵¹. Cette notion permet d'utiliser les contraintes de distance ambiguës de manière itérative lors de la modélisation moléculaire alors que d'autre logiciels utilisent uniquement les contraintes de distance RMN non ambiguës.

II.1.7.6.1. Contraintes de distance ambiguës

L'approche d'ADR consiste à considérer un pic NOE non plus comme la résultante d'un couplage dipolaire entre deux protons, mais comme la somme des contributions dipolaires de tous les candidats dont les fréquences de résonances sont proches, pouvant contribuer à l'intensité du pic de corrélation. Ainsi un pic NOE peut être considéré comme la superposition de n pic NOE, par conséquent la contrainte sera appliquée sur une distance moyenne calculée d'après la relation suivante:

$$b = \left(\sum_{i=1}^n (d_i)^{-6} \right)^{-1/6} \quad Eq\ 8$$

où chaque distance d_i correspond à la distance entre une paire de proton a_i et b_i et n représente le nombre des attributions possibles.

Au cours du calcul de dynamique moléculaire, la contribution de chaque candidat est évaluée d'après sa distance dans le modèle calculé et une telle contrainte ambiguë est satisfaite si au moins un des candidats est compatible selon le modèle

II.1.7.6.2. Le principe de fonctionnement de ARIA

Le calcul des structures tertiaires des peptides a été effectué de façon itérative (Figure II.1.7.6.2.1) par l'utilisation simultanée des logiciels, ARIA et CNS. ARIA utilise comme données initiales le projet CcpNmr, qui contient une table de déplacement chimique, une liste de pics NOEs attribués manuellement et les spectres RMN expérimentaux. Le logiciel ARIA accepte également des contraintes de liaisons hydrogènes, d'angles dièdres, RDCs, les ponts disulfures, les couplages scalaires, et les liaisons ioniques (coordinations au Zinc, par exemple). Au cours la première itération, it_0 , ARIA réalise une calibration des pics NOE et crée un nouveau spectre NOE et un nouveau fichier de contraintes de distances, qui est utilisé par le logiciel CNS pour générer un premier jeu de structures 3D des peptides ou protéines (200 structures). Les structures générées lors de it_0 sont aléatoires. On rentre ensuite dans un processus itératif, où chaque spectre NOE est rétro-calculé à partir les meilleures structures, 100 meilleures, de l'itération ($i-1$) en effectuant une attribution automatique à partir d'une liste des déplacements chimique que l'on fixe, afin de déterminer les constantes de

calibrations. Les volumes expérimentaux sont alors traduits en contraintes de distances que CNS utilise pour générer un nouveau jeu de structures. Les meilleures structures de l'itération précédente sont à nouveau analysées pour déterminer les contraintes violées systématiquement.

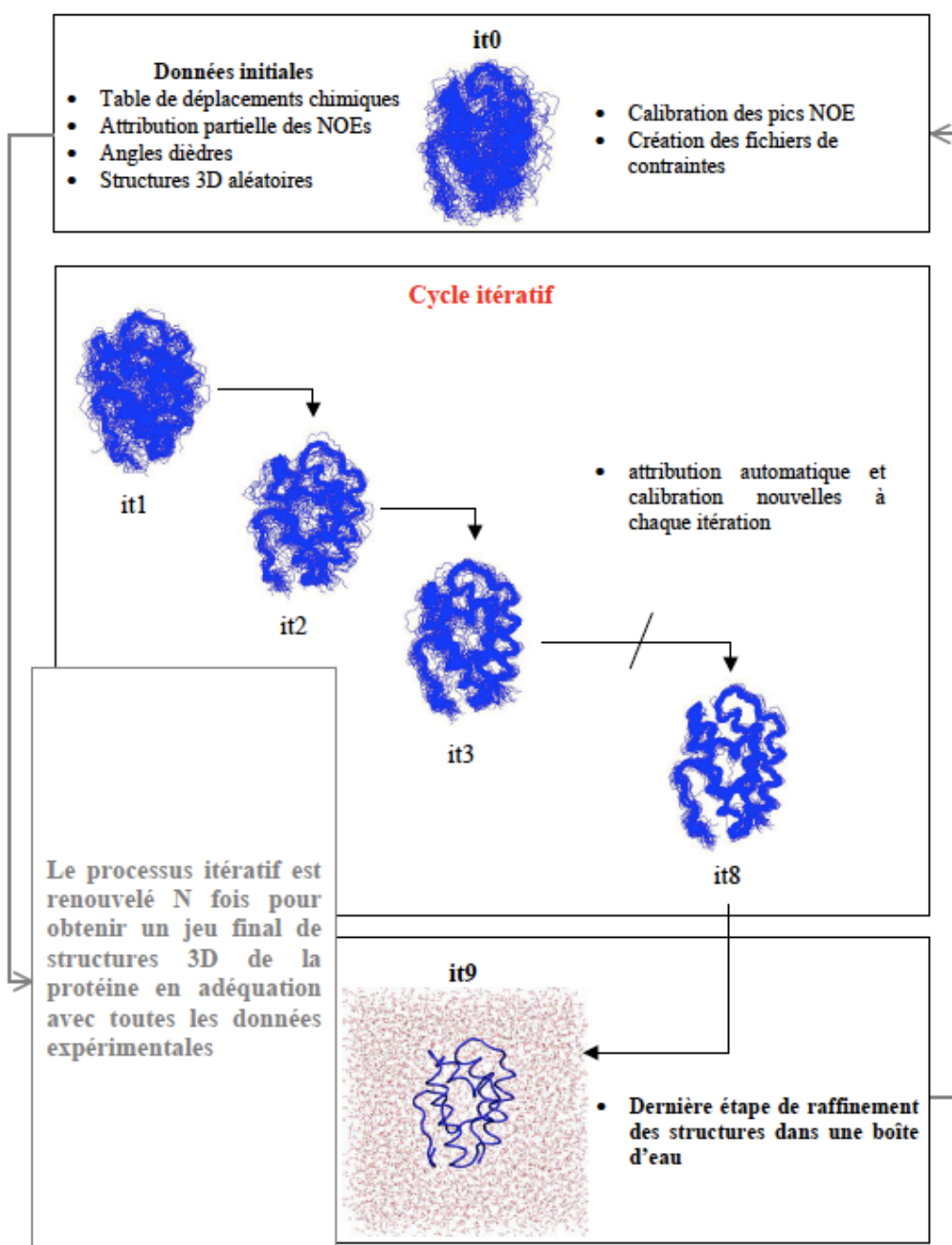


Figure II.1.7.6.2.1: Schéma simplifié et descriptif du processus itératif ARIA/CNS utilisé pour la modélisation moléculaire des peptides étudiés.

Le nombre d'itération réalisée par ARIA est fixé à 8 et au cours de ces itérations le seuil de violation des contraintes est fixé à 0.2 Å (défini par l'utilisateur) et les contraintes systématiquement violées sont éliminées. La neuvième itération correspond à une étape d'analyse et de raffinement des structures. Ce processus est renouvelé N fois jusqu'à l'introduction de toutes les données expérimentales qui doivent être en accord avec les structures de plus basses énergies obtenues.

II.1.7.6.2.1 Le champ de force

ARIA^{251,252} utilise via le programme CNS, le champ de force AMBER, ce dernier est un champ de force semi-empirique, représenté par des termes d'énergie physiques décrivant des interactions atomiques entre atomes liés ou non liés.

II.1.7.6.2.1.1 Energies potentielles d'interactions liées

Les énergies potentielles liées représentent les énergies correspondant aux déformations de la longueur de liaison, de l'angle entre les liaisons et des angles dièdres de torsion.

II.1.7.6.2.1.2 Energies potentielles d'interactions non liées

Les énergies non liées entre les atomes du système moléculaire peuvent être simulées par deux potentiels différents. Dans un premier temps, au cours du calcul, le potentiel sera défini uniquement à partir des interactions de Van der Waals, on parle alors de potentiel quartique. Puis, dans un second temps, souvent dans la phase de raffinement du calcul, la contribution coulombienne est ajoutée, elle représente l'interaction électrostatique du potentiel.

$$E_{\text{non-liée}} = E_{\text{Van der Waals}} + E_{\text{électrostatique}} \quad Eq\ 9$$

II.1.7.6.2.2 La calibration des pics NOEs

La calibration dans ARIA est effectuée au cours de chaque itération (i+1) à partir d'un jeu de structures initiales. Une distance moyenne $\langle d_{ij} \rangle$ est calculée sur les structures pour chaque paire de protons correspondant à un pic NOE de volume I_{ij} et un facteur de calibration « C » global est déduit pour chaque itération (i+1)²⁵³, selon la relation suivante

$$C = \sum_{NOE} \frac{1}{I_{ij} \langle d_{ij} \rangle^6} \quad Eq\ 10$$

avec $\langle d_{ij} \rangle$, la distance moyenne calculée sur les structures pour chaque paire de protons de la façon suivante :

$$\langle d_{ij} \rangle = \frac{1}{S} \sum_{s=1}^S d_{ij,s} \quad Eq\ 11$$

$d_{ij,s}$ distance calculée à partir de l'ensemble des structures de plus basse énergie S de l'itération précédente.

Ainsi les contraintes de distances observées $(d_{ij})^{obs}$ sont mesurées de la façon suivante:

$$(d_{ij})^{obs} = \frac{1}{(C * I_{ij})^{1/6}} \quad Eq\ 12$$

La difficulté majeure est le mouvement intramoléculaire des protons, qui rend difficile la quantification précise des distances inter protons. La flexibilité de la molécule dans les boucles et les parties terminales, peut induire une diminution de l'intensité NOE. Afin de prendre en considération ce phénomène, la notion d'intervalle de valeurs permises a été introduite pour les distances inter protons. L'erreur sur l'évaluation des contraintes de distance (Δ) est estimée dans ARIA à 12.5 % du carré de la distance observée $(d_{ij})^{obs}$.

Il est important de noter qu'ARIA offre la possibilité d'effectuer une calibration plus élaborée en prenant en compte la matrice de relaxation pour limiter les effets de la diffusion de spin, pour cela, il est important de connaître la valeur du temps que corrélation τ_c des peptides ou protéines étudiés.

II.1.7.6.2.3 Attribution des pics NOE ambigus

Le protocole ARIA repose sur la notion de contraintes ambiguës, et par cette approche, considère tous les candidats pouvant contribuer à l'intensité du pic de corrélation. Au cours du calcul de dynamique moléculaire, la contribution C_k de chaque candidat est estimée d'après les distances dans le modèle moléculaire déjà calculé de la manière suivante :

$$(C_k)^{obs} = \frac{(d_k)^{-6}}{\sum_{i=1}^n (d_i)^{-6}} \quad Eq\ 13$$

avec d_k , la distance moyenne de la paire de proton et K calculé sur les 100 structures de plus basse énergie de l'itération (i-1).

Pendant le cycle itératif, les contributions C_k sont classées par ordre décroissant et les candidats, contraintes ambiguës, ayant les plus petites contributions « C_k » sont progressivement exclues dès lors que

$$\sum_{i=1}^{N_p} C_k > p \quad Eq\ 14$$

p correspond à la valeur du seuil d'attribution, cette valeur est proche de 1 (0.999) à la première itération puis décroît progressivement pour atteindre la valeur de 0.8 à l'itération 8.

Une contrainte ambiguë est satisfaite si au moins un des candidats est compatible selon le modèle. Toutefois, la combinaison de contraintes ambiguës peut aider à orienter le calcul vers la bonne structure.

Afin de traiter correctement les pics NOE ambigus, au cours de notre étude nous avons optimisé deux paramètres pour l'obtention des structures tertiaires des peptides, ces deux paramètres sont : le seuil d'attribution p et la fenêtre du déplacement chimique.

II.1.7.6.2.4 Analyse et sélection des structures

Le logiciel ARIA/CNS permet grâce à la procédure de recuit simulé de générer un grand nombre de structures plus au moins en accord avec les données expérimentales issues de la l'analyse des spectres RMN. La qualité des structures obtenues doit être évaluée. L'analyse effectuée est basée sur les paramètres suivants :

- L'énergie intramoléculaire : la valeur de l'énergie obtenue à la fin du calcul de structure sert de critère pour juger de la qualité de la structure. Celle-ci est fonction des paramètres du champs de force et sera d'autant plus élevée que le nombre de violations expérimentales ou géométriques sera grand (plus la valeur est petite plus la structure est stable et fiable).
- Le nombre de violations : Après le raffinement, seules les structures possédant un faible nombre de violations des contraintes de distances ($< 0.2 \text{ \AA}$) sont conservées. Si plusieurs violations apparaissent de façon systématique sur des structures différentes, les spectres RMN à 2 dimensions NOESY sont réexaminés.
- Les cartes de Ramachandran : la distribution des couples (ϕ, φ) ne doit pas s'écarter des zones stériques permises²⁵⁴.

- La valeur de l'écart-type moyen entre les coordonnées atomiques (RMSD) : la convergence entre les structures générées est mesurée par l'écart types entre les positions des atomes du squelette peptidique de ces différentes structures.

Chapitre III: Résultats

Partie I

Identification des régions membranaires potentielles dans la glycoprotéine VP7 et caractérisation de l'accessibilité des sites de maturation par la trypsine.

III. Résultats

III.1 Identification des régions membranaires potentielles dans la glycoprotéine VP7 et caractérisation de l'accessibilité des sites de maturation par la trypsine.

III.1.1. Objectifs

Les études précédemment achevées et publiées par différent groupes montrent que les particules virales à triple couche protéique (TLP) induisent la perméabilisation de liposomes et de vésicules membranaires¹²⁸. Ces effets sont déclenchés par la solubilisation et la maturation des protéines VP4 et VP7^{151,152,157}, protéines de la couche externe du rotavirus.

Les protéines structurales de la couche externe du rotavirus sont sensibles à la concentration de calcium et aux protéases. Le clivage de VP4 par la trypsine^{101,255}, génère deux fragments, VP5* protéine membranaire de perméabilisation, et VP8*, l'hémagglutinine du rotavirus. Le réseau de protéines VP7 à la surface de la particule virale est formé seulement en présence de calcium¹²⁰ où les monomères de VP7 s'associent en trimères, qui interagissent fortement avec VP6²⁵⁶ et VP4. Lorsque la concentration en calcium est abaissée, VP7 ainsi que VP4 sont solubilisées conduisant à la formation de particules infectieuses à double couche, les DLP¹³², qui sont libérées dans le cytoplasme après destruction de la membrane plasmique par les fragments tryptiques des deux protéines structurales de la couche externe, VP7 et VP4 (VP5*). A l'heure actuelle, le mécanisme d'action de la protéine VP5* est connu^{37,257}, contrairement à celui de la glycoprotéine VP7.

Afin de déterminer le domaine tryptique de la glycoprotéine VP7, impliqué dans l'entrée du rotavirus et de comprendre le mécanisme moléculaire de déstabilisation des membranes par VP7, j'ai donc entrepris, dans un premier temps une analyse *in silico* de la séquence primaire de la protéine VP7, dont l'objectif était d'identifier les domaines membranaires potentiels de cette protéine et de caractériser les sites potentiels de maturation par la trypsine de cette protéine de la capsid externe.

III.1.2. Identification des régions membranaires

La prédiction de domaines membranaires a été réalisée en utilisant le programme PHDhtm et MPEX sur la séquence entière de la glycoprotéine VP7 mature, issue du clivage du peptide signal au niveau du site de maturation localisé entre les résidus A50 et Q51. Les résultats résumés sur la Figure III.1.2.1. A et B indiquent la présence d'une région prédite en segment

B. représentation des propriétés hydrophobe ou hydrophile des acides aminés dans la protéine VP7 mature

La prédiction de structure secondaire effectuée sur la protéine VP7 mature complète, indique que le fragment membranaire prédit en C-terminal (Figure III.1.2.2. A), adopte une structure en hélice alpha (Figure III.1.2.2. B). La représentation en roue hélicoïdale de ce domaine révèle ses propriétés amphipathiques (Figure III.1.2.2. C). Ce type de structure est caractéristique des peptides perforateurs des membranes¹⁹⁶.

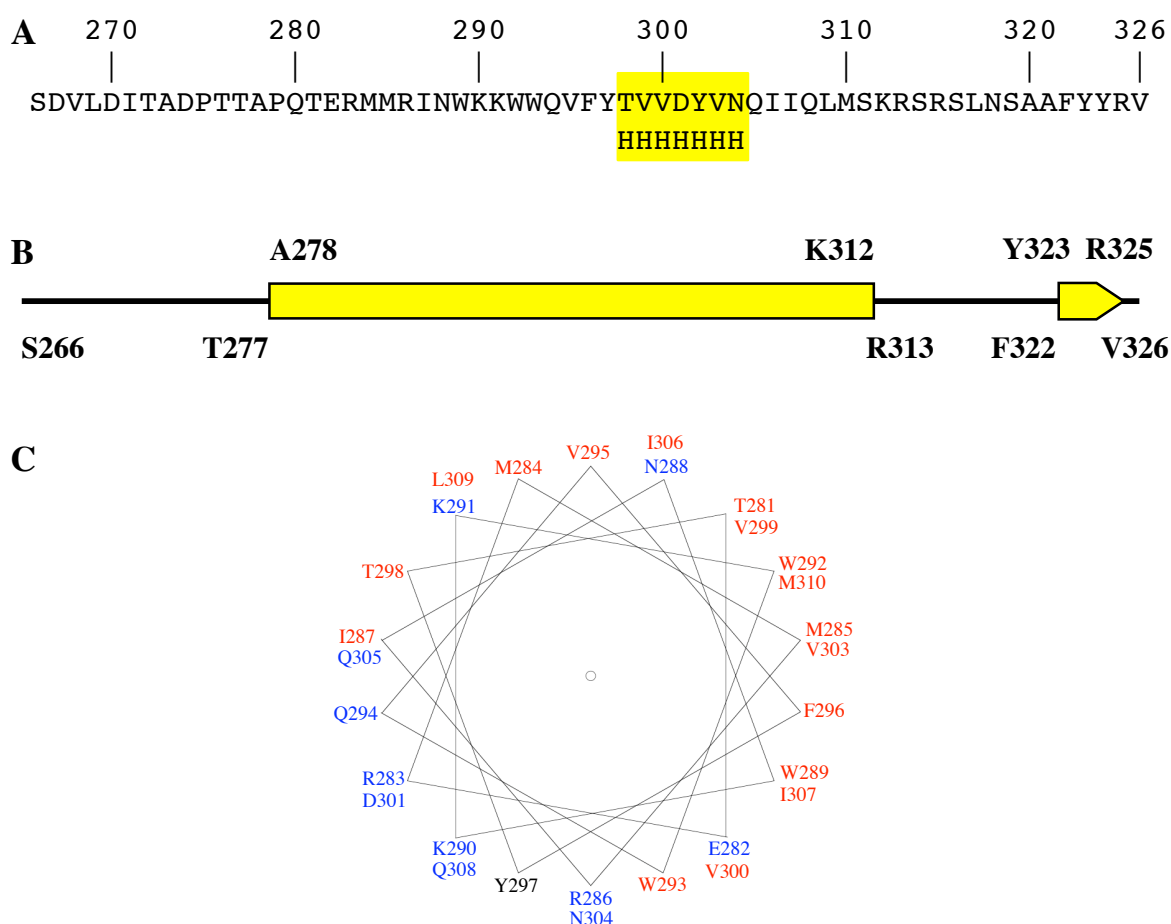


Figure III.1.2.2 : A. Prédiction d'une région membranaire de VP7 du côté C-terminal de la glycoprotéine en utilisant le programme PHDhtm (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_htm.html). B. Prédiction des structures secondaires effectuée à partir de la séquence entière de la glycoprotéine VP7 mature, indiquant que le segment membranaire est situé au milieu d'une région prédite en hélice- α . C. Représentation en roue hélicoïdale comportant le fragment membranaire, mettant en évidence les propriétés amphipathiques de ce domaine (rouge : résidus hydrophobes, bleu : résidus hydrophiles).

III.1.3. Caractérisation des sites de maturation par la trypsine de la glycoprotéine VP7

Les travaux effectués et décrits dans la littérature indiquent que des fragments tryptiques de la glycoprotéine VP7 induisent la perméabilité des membranes^{128,152}. L'analyse *in silico*, par des techniques d'alignements multiples, de la séquence entière de VP7 a été effectuée dans le but d'identifier les résidus arginine et lysine hautement conservés dans les différents groupes et stéréotypes de rotavirus. Cela nous a permis de mettre en évidence les domaines situés du côté C-terminal de VP7 qui comportent le fragment membranaire prédit (Figure. III.1.3.2).

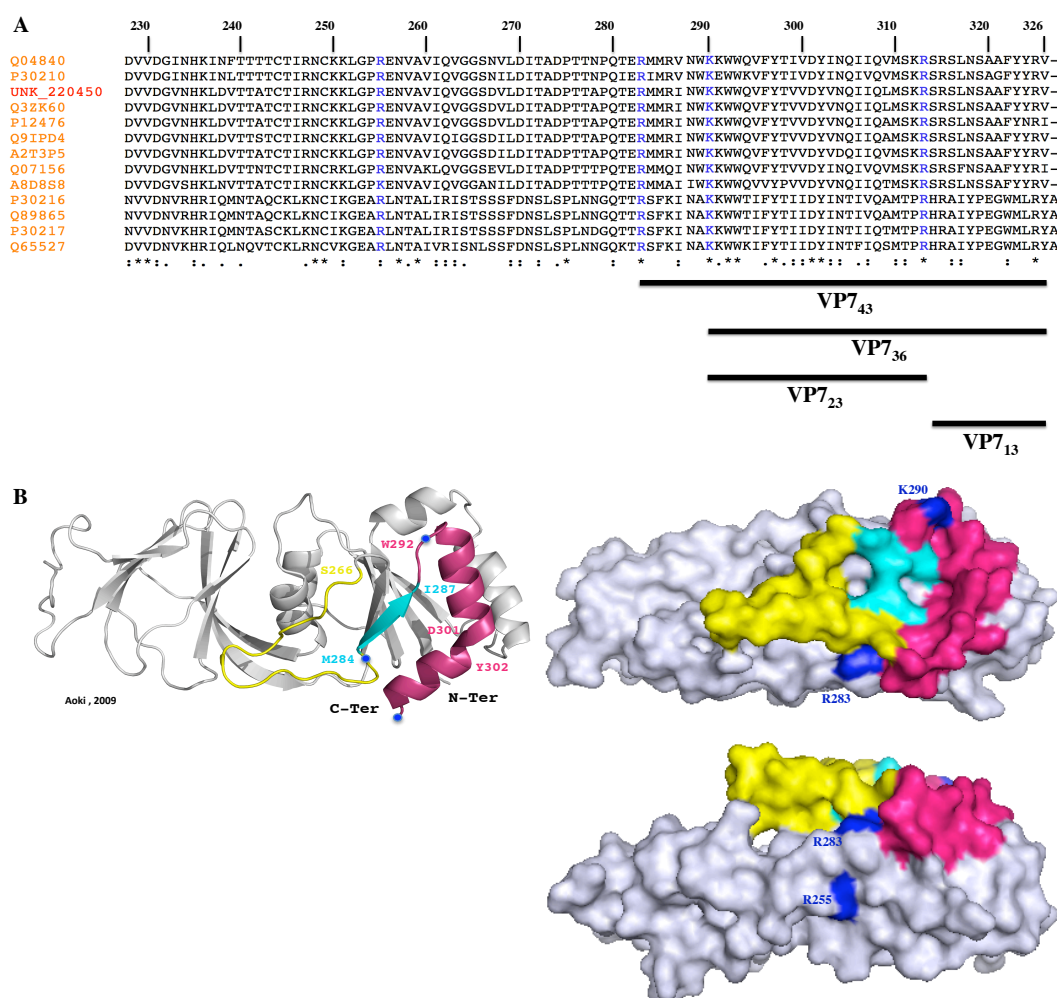


Figure III.1.3.1: A. Analyse *in silico* de la séquence de la glycoprotéine VP7 issue des différents groupes et stéréotypes de Rotavirus (alignements multiples), mettant en évidence les résidus R et K hautement conservés.

B. Localisation par examen de la structure cristallographique, des résidus R et K conservés dans la protéine native, au niveau des boucles (cercle bleu).

C. Représentation en surface de la protéine native VP7, montrant l'accessibilité des résidus R et K hautement conservés, indiqués en bleu.

Les résultats montrent non seulement, une très haute conservation des résidus R et K indiqués en bleu (Figure III.1.3.1. A, et B), mais également, une grande accessibilité à la trypsine qui clive la liaison peptidique impliquant le groupement carboxylique d'une lysine ou arginine par observation de la structure aux rayon-X³³ (Figure. III.1.3.1. B), qui montre que ces derniers sont situés sur des boucles.

Ces résultats ont été complétés par une analyse *in silico* en utilisant le programme PeptideCutter²⁵⁸, un logiciel de prédiction des sites potentiels de clivage par la trypsine. Les résultats obtenus indiquent de grandes probabilités de clivage par la trypsine de la liaison peptidique impliquant le groupement carboxylique des résidus R (Arginine) ou K (Lysine) hautement conservés (100%) soulignés en bleu, et des pourcentages plus faibles pour les résidus moins conservés (65%) soulignés en rouge (Figure. III.1.3.2.).

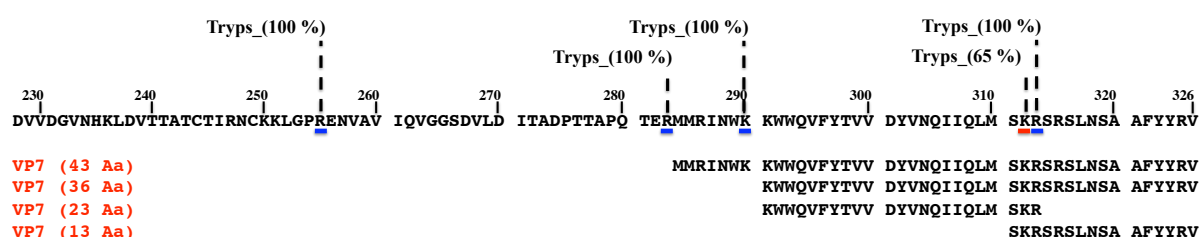


Figure III.1.3.2 : Prédiction des sites potentiels de clivage par la trypsine de la glycoprotéine VP7 en utilisant le logiciel PeptideCutter. Les acides aminés soulignés en bleu hautement conservés présentent une probabilité de clivage maximale alors que ceux soulignés en rouge sont moins conservés et ont une probabilité de clivage plus faible. Les peptides pouvant provenir de la maturation sont VP7₄₃, VP7₃₆, VP7₂₃ et VP7₁₃.

III.1.4. Synthèse des différents fragments de la glycoprotéine VP7, issus de la maturation par la trypsine.

Les prédictions de région membranaire ont indiqué une localisation du côté C-terminal de ce fragment qui possède la propriété de s'organiser en hélice amphipathique entouré de chaque côté de résidus R et K hautement conservés. De plus, l'analyse *in silico* en utilisant le logiciel PeptideCutter, indique une grande probabilité de clivage par la trypsine des liaisons peptidiques impliquant ces résidus conservés. L'identification de ces résidus au sein de la

structure tridimensionnelle de la protéine VP7 native, montre que ces derniers sont situés dans des boucles.

Les résultats obtenus nous ont conduit à la synthèse des différents peptides pouvant provenir de la maturation par la trypsine, VP7₄₃, VP7₃₆, VP7₂₃ et VP7₁₃, comportant le fragment membranaire prédit excepté VP7₁₃. Les séquences primaires des différents peptides sont représentées dans la Figure III.1.4.1.

Un peptide non tryptique, VP7₆₁, avait été proposé pour sa capacité potentielle à interagir avec les membranes par N. Morellet et J. Lepault, en se basant sur les travaux de S. Libersou. La caractérisation structurale de ce peptide dans un mélange CD₃OH/CDCl₃ (1/1) avait fait l'objet de mon stage de mastère 2.



Figure III.1.4.1 : Séquence primaire des différents peptides potentiellement issus de la maturation par la trypsine et comportant le fragment membranaire prédit.

Les peptides dérivés de la glycoprotéine VP7 ont été synthétisés par synthèse automatique sur un support solide selon la stratégie Fmoc, comme précédemment décrite dans la partie II.1.3 (Chapitre II: Matériels et Méthodes). La pureté et la masse exacte des peptides ont été vérifiées par HPLC et spectrométrie de masse MALDI-TOF (Figure III.1.4.2).

L'analyse par spectrométrie de masse des différents peptides a été effectuée sur la plateforme Spectrométrie de Masse et Protéomique, Université Pierre et Marie Curie. L'ensemble des spectres obtenus et analysés par Mr Bolbach, montre que chaque peptide est pur, la pureté est estimée supérieure à 95%. Les peptides ont été conservés au sec (-20 °C) après une étape de lyophilisation.

Le rendement de synthèse a été déterminé pour chaque peptide, et les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Peptides	Rendement de synthèse peptidique avant purification (%)	Rendement de synthèse peptidique après purification (%)
VP7 ₆₁	16.34	3
VP7 ₄₃	22.14	3.32
VP7 ₃₆	22.43	3.59
VP7 _{23wt}	23.77	2.03
VP7 ₁₃	65.19	10.43

Tableau III.1.4.2 : Tableau récapitulatif du rendement global de la synthèse des différents peptides dérivés de la glycoprotéine VP7, contenant la région membranaire prédite in silico, excepté VP7₁₃, avant et après purification.

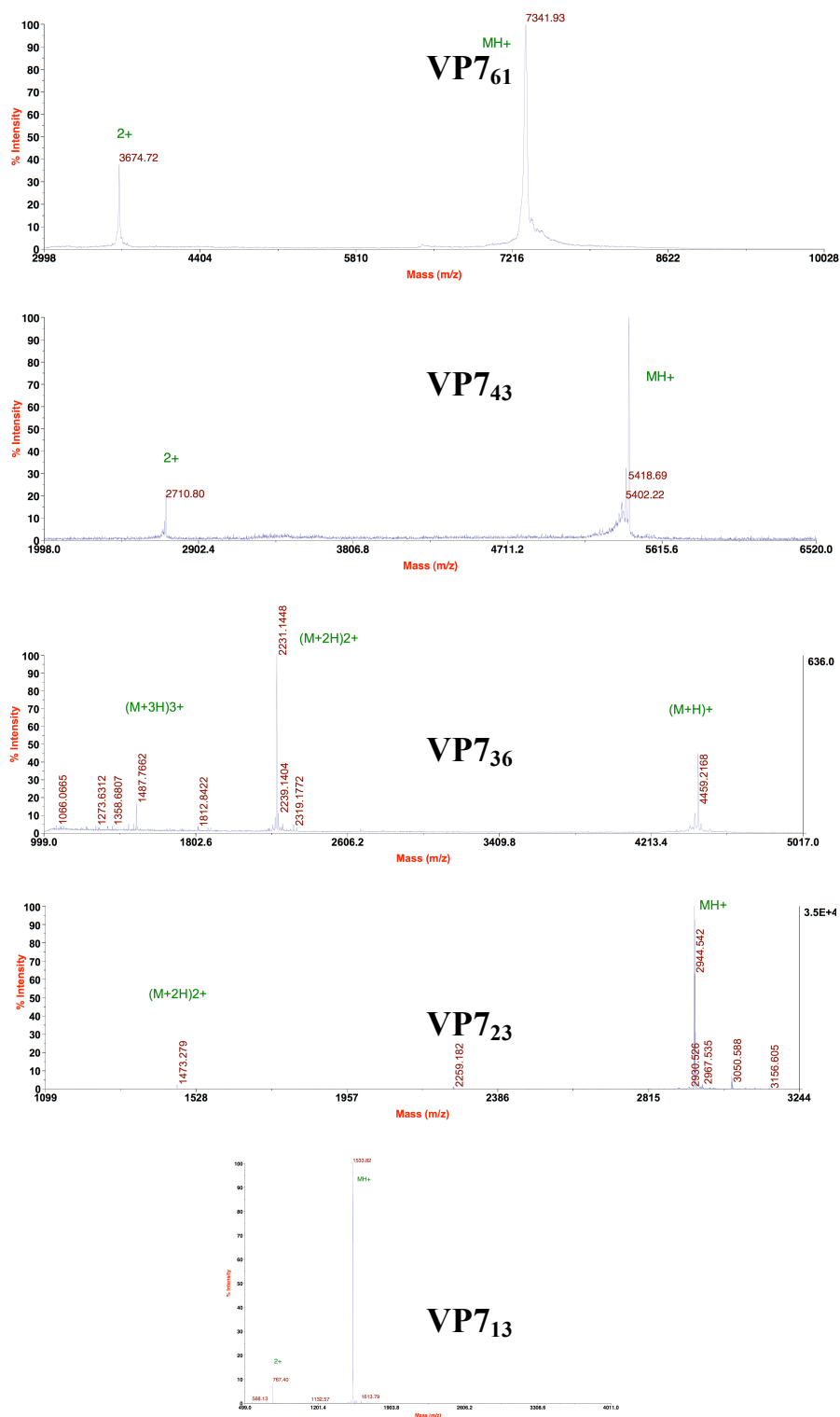


Figure III.1.4.2 : Spectres de masse MALDI-TOF ions positifs en mode réflecteur des différents peptides après purification par HPLC. Les peptides sont obtenus par synthèse chimique en phase solide, selon la stratégie Fmoc.

III.1.5. Discussion et conclusion

Quel que soit son état oligomérique, trimérique ou monomérique, la glycoprotéine VP7 native est incapable d'induire la déstabilisation de la membrane des endosomes. Cependant, plusieurs groupes ont démontré que la solubilisation de VP7 induite par la variation de la concentration du calcium dans les sous compartiments des cellules épithéliales (endosomes) et sa maturation par la trypsine, entraîne la libération de peptides capables de perméabiliser les membranes biologiques et artificielles. Pourtant, jusqu'à présent jamais ces peptides perforateurs de membranes, dérivés de la maturation par la trypsine de la glycoprotéine VP7, n'avaient été identifiés. Dans une première étape, à l'aide des outils de bioinformatique, nous avons identifié dans la partie C-terminale de VP7, plusieurs peptides contenant un potentiel fragmentation membranaire, prédit en hélice α amphipathique, caractéristique des peptides perforateurs des membranes²⁵⁹, peptides lytiques tels que les peptides antimicrobiens, dont les mécanismes d'action sont décrits dans la littérature²⁶⁰.

Les hélices α amphipathiques sont parmi les plus abondantes et les plus répandues dans la nature. La répartition des acides aminés en deux faces hydrophile et hydrophobe, permet d'expliquer la capacité de ces peptides à interagir avec les membranes¹⁹⁶.

L'association de ces études *in silico* à d'autres méthodes telles que les études de perméabilisation des vésicules contenant une sonde fluorescente extrinsèque et la PWR, nous permettront dans un premier temps, de caractériser l'activité biologique des différents fragments.

Partie II

**Caractérisation de l'activité biologique des différents peptides
dérivés de la glycoprotéine VP7 après maturation par la
trypsine**

III.2 Caractérisation de l'activité biologique des différents peptides dérivés de la glycoprotéine VP7 après maturation par la trypsine

III.2.1. Objectif

Les résultats précédents obtenus par analyse *in silico* de la séquence primaire de la glycoprotéine VP7, indiquent que celle-ci contient un domaine prédit en hélice α amphipathique entouré de chaque côté par des résidus arginine et lysine hautement conservés. D'ailleurs, nous avons pu montrer par observation de ces résidus sur la structure 3D de la protéine VP7 native, obtenue par cristallographie aux rayons X, que ces résidus sont situés au niveau des boucles dans la protéine et sont accessibles.

Dans cette seconde partie j'ai étudié le rôle biologique des différents peptides dérivés de VP7 que j'ai synthétisés. Dans une première étape, j'ai effectué des tests de perméabilisation de membranes modèles de vésicules larges unilamellaires (LUVs) d'Egg PC renfermant de la 6-carboxyfluorescéine (6-CF) par les différents peptides. J'ai procédé ensuite à une comparaison de l'effet de ces peptides sur les membranes modèles, afin d'identifier le domaine minimum d'interaction avec les membranes ayant la plus grande activité de perméabilisation. Enfin, une fois le peptide le plus actif identifié, j'ai étudié son efficacité à perméabiliser les membranes modèles en fonction de sa concentration.

Par la suite, j'ai analysé l'effet de la composition lipidique de la membrane sur l'efficacité du domaine minimum le plus actif à perméabiliser les membranes modèles.

Enfin nous avons étudié, à l'aide de la spectroscopie de résonance plasmonique aux ondes guidées (PWR), l'adsorption de ces peptides sur des bicouches modèles, leur effet sur les membranes et nous avons déterminé les constantes d'affinité en jeu dans ces interactions peptides-lipides en collaboration avec l'équipe d'I Alves (CBMN, Bordeaux).

III.2.2. Interaction des peptides dérivés de la glycoprotéine VP7 avec les membranes modèles de vésicules larges unilamellaires (LUVs)

III.2.2.1 Interaction des peptides dérivés de la glycoprotéine VP7 avec les vésicules large unilamellaires d'Egg PC

La capacité des peptides dérivés de la glycoprotéine VP7 à perméabiliser les membranes a été déterminée sur des systèmes membranaires modèles de LUVs d'Egg PC, d'environ 120 à 140 nm de diamètre, encapsulant un marqueur fluorescent, la 6-CF.

Pour la préparation des LUVs, 3 mg de lipides d'Egg PC ont été, dans un premier temps, solubilisés dans un mélange de méthanol/chloroforme (1/1 : 50/50 μ L). Les solvants organiques ont ensuite été évaporés à sec à l'aide d'un jet d'argon pour former un film lipidique à la surface d'un tube en verre à bout arrondi qui a été placé sous vide pendant 4 heures afin d'éliminer toute trace de méthanol et de chloroforme. Ce dernier a été réhydraté avec 200 μ L d'une solution de 6-CF à 60 mM (solubilisée dans du PBS à 1 mM et à pH 7.5), pour avoir une concentration finale en lipide de 0.02 M. Afin d'assurer une bonne dispersion des lipides et la formation de vésicules multilamellaires (MLV), la solution lipidique a été soumise à agitation, à une température supérieure à la température de transition de phase (T_m), pendant 30 mn. Ensuite à l'aide d'un appareil à extrusion (Avanti Mini-Extruder), la suspension de MLVs (200 μ L) a été passée sous pression dix fois à travers des membranes filtrantes en polycarbonate (Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama 35007-9105) dont la taille des pores est respectivement de 200 nm puis de 100 nm, afin d'obtenir les LUVs. La 6-CF non encapsulée a été séparée des vésicules par chromatographie d'exclusion stérique en utilisant une colonne en verre de Sephadex G75. A la fin de cette étape, 2 mL d'une solution lipidique de LUVs d'Egg PC ont été obtenus.

La Figure III.2.2.1.1 représente la perméabilisation des LUVs d'Egg PC par les différents peptides dérivés de la glycoprotéine VP7, ajoutés aux membranes modèles sous forme monomère à la concentration de 1 μ M, déterminée par mesure de la turbidité. Après 400 secondes d'incubation, les résultats montrent que les peptides VP7₆₁, VP7₄₃, VP7₃₆ et VP₂₃ induisent respectivement la perméabilisation de 91%, 98.5%, 100% et 100% des LUVs d'Egg PC alors que VP7₁₃ n'a aucun effet sur les membranes. Ces résultats suggèrent que le domaine potentiellement membranaire prédit en hélice α amphipathique est certainement responsable de la perméabilisation des membranes (voir Résultats, partie III.1.2 et III.1.4).

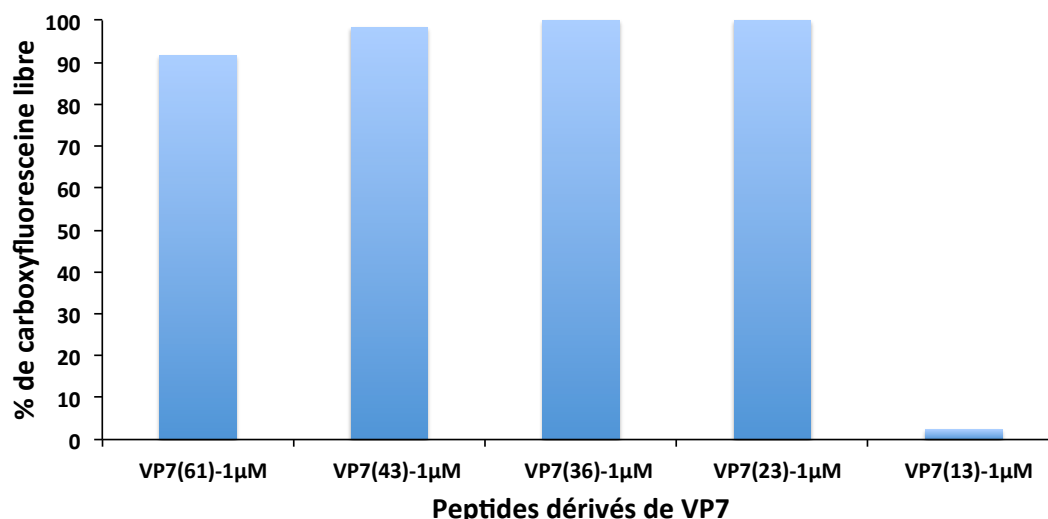


Figure III.2.2.1.1 : Pourcentage de 6-Carboxyfluorescéine libérée des LUVs d'Egg PC, induite par les différents peptides dérivés de VP7 à 1 μ M après 400 secondes d'incubation à 37°C et à pH 7.5. La concentration des lipides est de 20 μ M.

III.2.2.2 Comparaison de l'effet des peptides dérivés de la glycoprotéine VP7 sur les membranes modèles de vésicules larges unilamellaires d'Egg PC

L'efficacité de chaque peptide dérivé de la maturation par la trypsine de la glycoprotéine VP7, a été déterminée par mesure des pentes de la tangente à l'origine dans la partie linéaire de chaque courbe de cinétique de perméabilisation des LUVs d'Egg PC (Figure III.2.2.2.1). Les valeurs des pentes à l'origine sont indiquées dans le tableau III.2.2.2.1, celles-ci correspondent à la variation du pourcentage de 6-CF libre en fonction du temps (vitesse de libération de la 6-CF), qui varie en fonction de l'efficacité de chaque peptide à perméabiliser les membranes.

Peptides dérivés de la glycoprotéine VP7	Pente de la tangente à l'origine (% de 6-CF libre / temps (s))
VP7 ₆₁	1.4358
VP7 ₄₃	3.8066
VP7 ₃₆	9.8874
VP ₂₃	22.464

Tableau III.2.2.2.1 : Comparaison de l'effet des différents peptides (1 μ M) dérivés de la glycoprotéine VP7 sur la perméabilisation des membranes modèles des LUV d'Egg PC, après 400 secondes d'incubation à 37°C et à pH 7.5. La pente de la tangente à l'origine a été mesurée dans la partie linéaire des courbes de cinétique pour chaque peptide (Figure III.2.2.2.1). La concentration des lipides est de 20 μ M.

Les résultats montrent que dans ces conditions expérimentales, en fonction de la nature des lipides et de la concentration en peptide utilisée, la perméabilisation des membranes est dépendante de la séquence primaire de chaque peptide. La comparaison de l'effet de chaque peptide par analyse des courbes de cinétiques de libération de la 6-CF (Figure III.2.2.2.1), puis par détermination des valeurs des pentes à l'origine (tableau III.2.2.2.1), indique clairement que le peptide VP7₂₃ est celui présentant la plus grande efficacité de perméabilisation des membranes des LUVs d'Egg PC. Ceci se traduit par une augmentation plus importante de la libération de 6-CF dans un délai de temps très bref (Figure III.2.2.2.1). Ces résultats ont été consolidés par la mesure des constantes d'affinité des interactions peptide-lipides, à l'aide de la spectroscopie PWR.

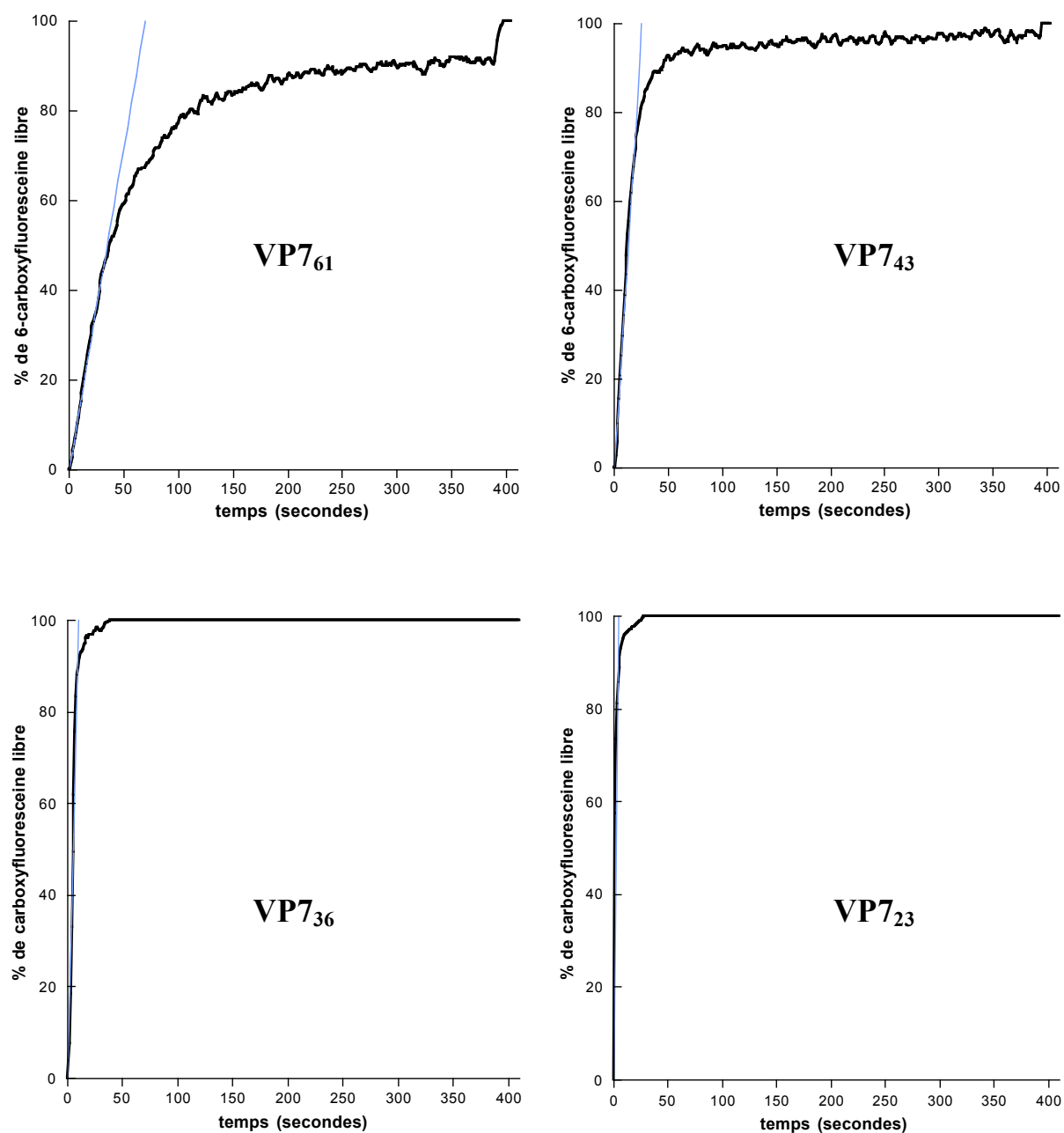


Figure III.2.2.2.1 : Cinétique de libération de la 6-CF dans la solution induite par les différents peptides dérivés de la glycoprotéine VP7 à 1 μM après 400 secondes d'incubation à 37°C. Chaque peptide est ajouté dans la suspension des LUVs d'Egg PC à 20 μM dans un tampon PBS 1X (pH = 7.4) au temps $t = 0$. Le 100% d'externalisation de la 6-CF a été déterminé par addition de 0.1 % de Triton (X-100) dans le milieu réactionnel.

III.2.2.3 Effet de la concentration en peptide VP7₂₃ sur la perméabilisation des vésicules larges unilamellaires d'Egg PC

Après avoir démontré que le peptide VP7₂₃ présentait la plus forte efficacité et la plus grande activité sur les membranes modèles des LUVs d'Egg PC, nous avons procédé à l'étude de l'efficacité d'interaction peptide-membrane en fonction du rapport peptide/lipide. Différentes concentrations de peptides, de 1 μ M à 7.82 nM ont été testées, tandis que les concentrations en lipides ont été fixées à 40 μ M et celle de la 6-CF à 60 mM.

La solution de LUVs à 40 μ M, a été préparée telle que décrite précédemment dans le paragraphe III.2.2.1, en utilisant 6 mg de lipides d'Egg PC.

La Figure III.2.2.3.1, représente les cinétiques de libération de la 6-CF, indiquée par l'augmentation de la fluorescence du milieu. Les résultats obtenus dans la gamme des concentrations utilisées, montrent que la perméabilisation des LUVs d'Egg PC est dépendante de la concentration en peptide présent dans le milieu réactionnel. On peut en déduire que pour les concentrations de VP7₂₃ \geq 125 nM, le peptide présente une plus forte affinité pour les membranes.

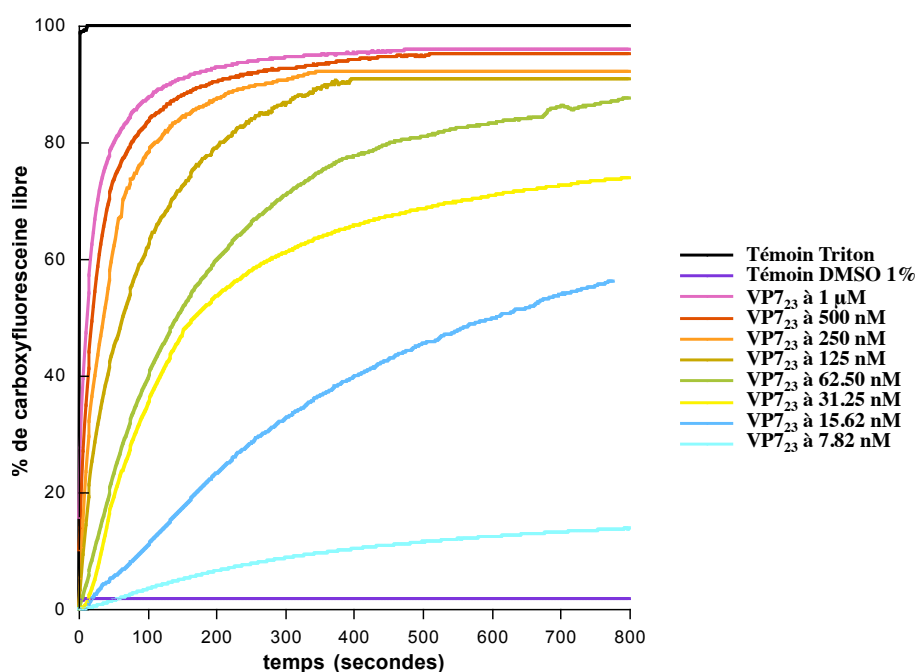


Figure III.2.2.3.1: Cinétique de libération de la 6-CF dans le milieu réactionnel induite par l'addition du peptide VP7₂₃ à différentes concentrations décroissantes. Le peptide dérivé de la glycoprotéine VP7 est ajouté à des suspensions de LUV d'Egg PC à 40 μ M à 37°C, dans un tampon (PBS 1 X et à pH =7.4) au temps $t=0$. Le 100% de lyse a été déterminé par addition de 0.1 % Triton (X-100) dans le milieu réactionnel.

La cinétique du DMSO est utilisé comme témoin, puisque la solution mère du peptide VP7₂₃ (1 mM) est en solution dans 100% de DMSO. Le résultat obtenu, indique que le DMSO n'induit pas la perméabilisation des membranes modèles.

La pente de la tangente à l'origine dans la partie linéaire de chaque courbe de cinétique de perméabilisation des LUVs d'Egg PC, a été déterminée pour différentes concentrations en peptide. Les valeurs sont résumées dans le tableau III.2.2.3.1 ci-dessous.

Concentration en peptide VP7 ₂₃ dérivé de la glycoprotéine VP7 (nM)	Pente de la tangente à l'origine (% de 6-CF libre / seconde)
1000	4.58
500	3.17
250	2.36
125	1.44
62.50	0.42
31.25	-
15.62	-
7.82	-

Tableau III.2.2.3.1 : Effet de la concentration en peptide VP7₂₃, dérivés de la glycoprotéine VP7, sur la perméabilisation des membranes modèles des LUVs d'Egg PC, après 800 secondes d'incubation à 37°C et à pH 7.5. La mesure de la pente de la tangente à l'origine dans la partie linéaire des courbes de cinétique a été effectuée pour les différentes concentrations en peptide (Figure III.2.2.3.1). La concentration des lipides est de 40 µM.

III.2.2.4 Effet de la composition lipidique des vésicules larges unilamellaires, sur l'efficacité du peptide VP7₂₃ à déstabiliser les membranes

Dans le but de déterminer l'importance et la contribution de la composition lipidique, sur l'efficacité du peptide VP7₂₃, dérivé de la glycoprotéine VP7, à induire la perméabilisation des membranes modèles, plusieurs compositions lipidiques ont été testées.

Les LUVs utilisées sont composées d'Egg PC ou bien d'extrait cellulaire de foie, à 40 μM . Elles ont été préparées tel décrit précédemment dans le paragraphe III.2.2.1, en utilisant 6 mg de lipides pour chaque solution

La Figure III.2.2.4.1, présente la perméabilisation de deux types de membranes modèles différentes, les LUVs d'Egg PC et les LUVs d'extrait cellulaire de foie, induite par VP7₂₃. Le peptide a été ajouté aux LUVs sous forme monomère à la concentration de 1 μM . Après 10 secondes d'incubation, le peptide VP7₂₃ induit la perméabilisation de 50% des LUVs d'Egg PC et moins de 3% de LUVs d'extrait cellulaire total de foie.

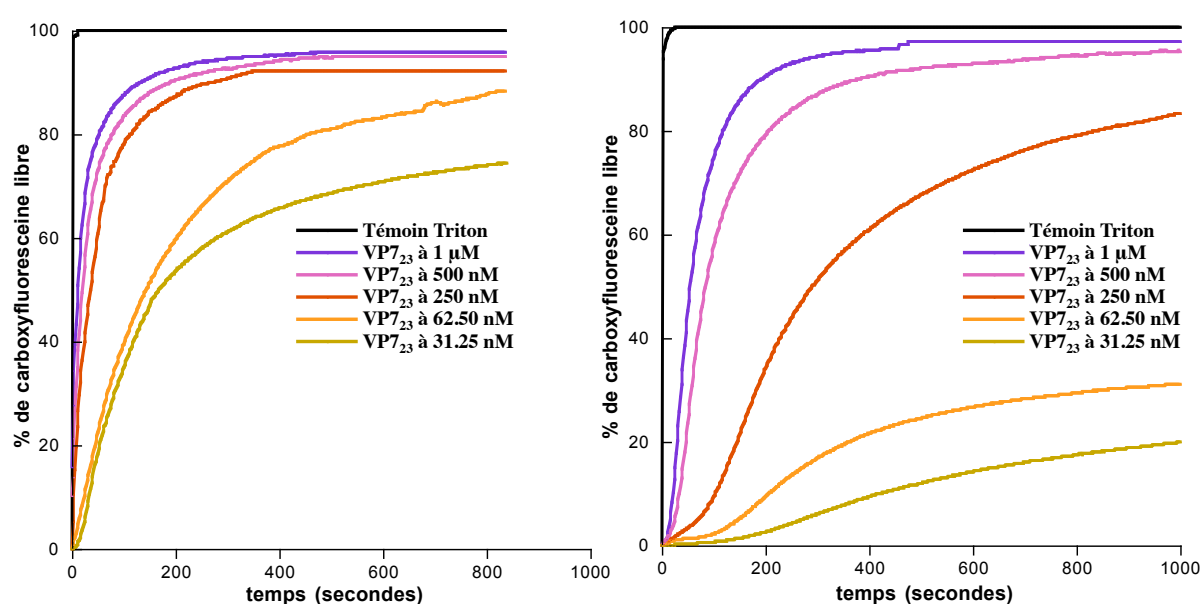


Figure III.2.2.4.1 : Cinétique de la libération de la 6-CF dans le milieu réactionnel induite par addition de différentes concentrations décroissantes du peptide VP7₂₃. Le peptide dérivé de la glycoprotéine VP7 est ajouté dans les suspensions de LUVs à 40 μM , d'Egg PC (A) ou bien d'extrait cellulaire total de foie (B), à 37°C, dans un tampon (PBS 1 X et à pH = 7.4) au temps $t = 0$. Le 100% de lyse a été déterminé par addition de 0.1 % Triton (X-100) dans le milieu réactionnel.

Les résultats indiquent clairement que l'efficacité du peptide à déstabiliser les membranes varie en fonction de la composition lipidique, et que cette différence est d'autant plus importante que les concentrations sont faibles. Des études similaires effectuées par Valcarcel, ont permis de montrer que l'efficacité de perméabilisation des membranes modèles par la Sticholysine I et II dépend de la composition lipidique²⁶¹. D'autres travaux menés par wildman et al par RMN du ³¹P sur un peptide antimicrobien (LL-37) montrent également l'effet de la composition lipidique sur l'efficacité du peptide à déstabiliser les membranes²⁶².

Les résultats concernant la mesure de la pente à l'origine des courbes cinétiques, correspondant à la vitesse de libération de la 6-CF après perméabilisation des membranes par VP7₂₃, sont résumées dans le tableau III.2.2.4.1. La comparaison des différentes valeurs pour les mêmes concentrations en peptide, révèlent clairement que le peptide VP7₂₃ présente une plus forte efficacité à déstabiliser les membranes modèles d'Egg PC, et que cette différence est d'autant plus importante que la concentration est faible.

Concentration en peptides VP7 ₂₃ , dérivé de la glycoprotéine VP7 (nM)	Pente de la tangente à l'origine (% de 6-CF libre / seconde)	
	LUV d'Egg PC	LUV extrait total de foie
1000	4.58	0.85
500	3.17	0.54
250	2.36	-
62.50	0.42	-
31.25	-	-

Tableau III.2.2.4.1: Comparaison de l'effet de la composition lipidique sur l'efficacité du peptide VP7₂₃, dérivé de la glycoprotéine VP7, à induire la perméabilisation des membranes modèles, après 1000 secondes d'incubation à 37°C et à pH 7.5. La mesure de la pente à l'origine dans la partie linéaire des courbes de cinétique pour chaque concentration en peptide est reportée. La concentration des lipides est de 40 µM.

III.2.2.5 Le cholestérol joue un rôle dans l'efficacité d'interaction du peptide VP7₂₃ avec les membranes modèles

L'une des principales caractéristiques des membranes cellulaires eucaryotes est la présence d'une grande quantité de cholestérol. Afin de déterminer l'effet du cholestérol sur la capacité du peptide VP7₂₃ à déstabiliser les membranes modèles, des tests de perméabilisation des LUVs d'Egg PC et d'Egg PC-Cholestérol, ont été effectués.

Les LUVs à 40 μM ont été préparées, tel décrit dans le paragraphe III.2.2.1, en utilisant 6 mg d'un mélange lipidique composé de 80% d'Egg PC et 20% de cholestérol, ou bien uniquement d'Egg PC.

Les tests de perméabilisation des LUVs constituées d'un mélange lipidiques d'Egg PC (80 moles %) et de cholestérol (20 moles %), mettent en évidence une fois de plus l'importance de la composition lipidique des LUVs sur l'efficacité du peptide VP7₂₃ à déstabiliser les membranes modèles (Figure III.2.2.5.1).

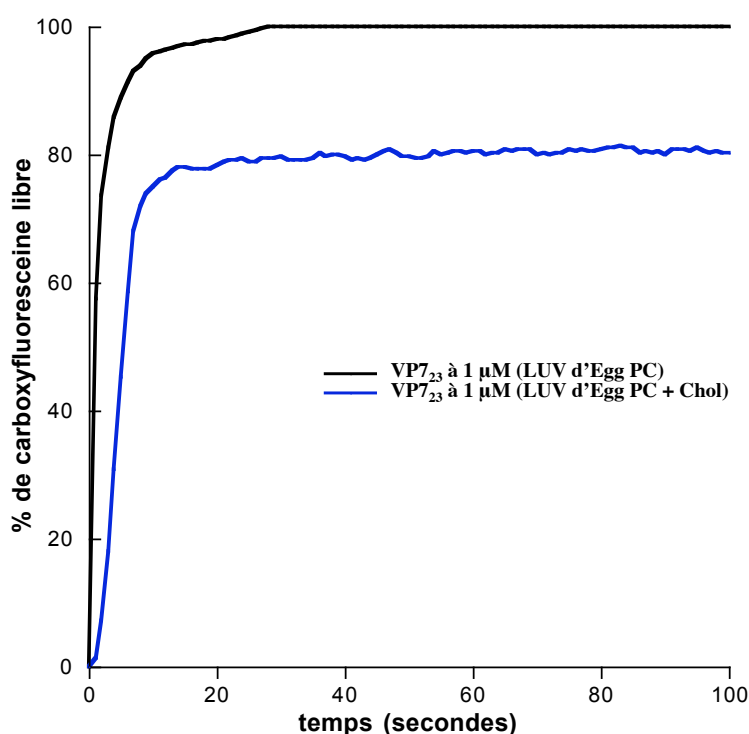


Figure III.2.2.5.1 : Cinétique de libération de la 6-CF induite par le peptide VP7₂₃, dérivé de la glycoprotéine VP7 à 1 μM après 100 secondes d'incubation à 37°C. Le peptide est ajouté dans la suspension de LUVs d'Egg PC (courbe noire) ou d'Egg PC-Cholestérol (courbe Bleue) au temps $t = 0$. Le 100% d'externalisation de la 6-CF a été déterminé par addition de 0.1 % Triton (X-100) dans le milieu réactionnel.

Les vitesses de libération de la 6-CF ont été déterminées par la mesure des pentes de la tangente à l'origine des courbes de cinétiques. Les résultats résumés dans le tableau III.2.2.5.1, indiquent que le cholestérol réduit l'effet du peptide VP7₂₃ avec les membranes modèles. Des effets similaires sur la perméabilisation des membranes modèles par la mëlittine²⁶⁰ ont été observés par Feigin et al en 1995. Ce phénomène peut être lié à

l'augmentation de la cohésion et de la rigidité des membranes²⁶³, entraînant ainsi une perte de la flexibilité membranaire, probablement essentielle pour l'interaction du peptide avec la membrane.

Concentration en peptides VP7 ₂₃ , dérivé de la glycoprotéine VP7 (μM)	Pente de la tangente à l'origine (% de 6-CF libre / seconde)	
	LUV d'Egg PC	LUV d'Egg PC - Cholestérol (80 moles% d'Egg PC +20 moles% de Cholestérol)
1	22.464	7.58

Tableau III.2.2.5.1: Mise en évidence de l'effet du cholestérol sur l'efficacité du peptide VP7₂₃, dérivé de la glycoprotéine VP7, à induire la perméabilisation des membranes modèles d'Egg PC et Egg PC-Cholesterol, après 100 secondes d'incubation à 37°C et à pH 7.5. La mesure de la pente de la tangente à l'origine dans la partie linéaire des courbes de cinétiques a été déterminée pour une concentration en peptide de 1 μM et une concentration en lipides de 20 μM.

Conclusion

Les résultats de nos tests de perméabilisation des membranes modèles, induite par les différents peptides potentiellement issus de la maturation par la trypsine de la glycoprotéine VP7, sont en accord avec les études précédentes effectuées par différents groupes^{128,152}. Ces résultats renforcent l'idée qu'un fragment membranaire prédit en hélice α amphipathique constitue une caractéristique des peptides perforateurs de membranes²⁵⁹. De plus ces études nous ont permis de montrer que :

- Les peptides dérivés de la glycoprotéine VP7 par la maturation à la trypsine, comportant le domaine prédit en hélice α amphipathique, ont la capacité de déstabiliser les membranes modèles.
- Le peptide VP7₂₃ présente la plus forte efficacité pour déstabiliser les membranes par comparaison avec les autres peptides sélectionnés, VP7₆₁, VP7₄₃, VP7₃₆ et VP7₁₃.
- La capacité du peptide VP7₂₃ à déstabiliser les membranes est fonction de la concentration en peptide et de la composition lipidique des membranes modèles.

- Le cholestérol réduit l'effet du peptide VP7₂₃ sur les membranes modèles d'Egg PC-Cholesterol par augmentation de la cohésion et de la rigidité des membranes entraînant une modification de l'interaction entre VP7₂₃ et les membranes.

III.2.3. Etudes par PWR de l'interaction des peptides dérivés de la glycoprotéine VP7 avec les bicouches lipidiques supportées

Dans la partie III.2.2, nous avons démontré que les peptides dérivés de la glycoprotéine VP7 sont capables de déstabiliser différentes membranes modèles, cependant le mécanisme par lequel ces peptides induisent la perméabilisation des membranes à l'échelle macromoléculaire reste inconnu.

La spectroscopie de résonance plasmonique de surface (PWR) nous a permis de suivre l'adsorption et l'effet de chaque peptide dérivé de la glycoprotéine VP7 sur les bicouches lipidiques. Cette technique (voir partie Matériels et Méthodes) est basée sur le couplage d'une part entre les plasmons (oscillation des charges) d'une mince couche métallique (Ag) excitée par une lumière monochromatique, et d'autre part, les ondes guidées par une couche diélectrique (silice) qui couvre le métal. Ce couplage génère une onde évanescente qui se propage au delà de la couche de silice. L'intensité du champ électrique généré par cette onde diminue exponentiellement avec la distance entre la surface de la silice et le milieu d'émergence.

Les ondes évanescentes générées par la lumière p-polarisée et s-polarisée caractérisent respectivement les propriétés optiques perpendiculairement et parallèlement au plan de la bicouche immobilisée en surface. Les modifications de la densité en masse, dues à l'addition ou l'élimination de masse de la membrane (Δm), causent des déplacements de même sens et de même amplitude des deux composantes de la lumière (Δs et Δp), on parle donc de changements isotropiques. Tandis que les altérations en structure (Δstr), vont causer des changements anisotropiques qui se traduisent par les déplacements de l'angle d'incidence pour les deux composantes de la lumière (Δs et Δp) dans deux sens opposés²⁶⁴. Enfin, cette technique ne nécessite l'utilisation ni de molécules marquées ni de molécules fluorescentes.

Dans le cadre de nos travaux, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'interaction des peptides dérivés de la glycoprotéine VP7 avec les bicouches d'Egg PC ou bien d'Egg PC-Cholestérol, utilisées comme modèle membranaire, afin de déterminer les constantes de dissociation apparente pour l'ensemble des peptides. Nous avons également étudié la

contribution électrostatique de l'interaction sur l'efficacité des peptides VP7₆₁ et VP7₃₆ à déstabiliser les membranes.

III.2.3.1 Préparation des bicouches supportées à la surface du cristal de PWR

La méthode de préparation des bicouches lipidiques d'Egg PC ou d'Egg PC-Cholestérol est basée sur les mêmes principes qui régissent la formation spontanée des bicouches lipidiques librement suspendues décrits par Mueller²⁶⁵. Cette méthode a été précédemment rapportée²⁶⁶⁻²⁶⁹. Il s'agit d'introduire un petit volume d'une solution lipidique à 8 mg/ml solubilisée dans un mélange de butanol/squalène (0.93 :0.7, V/V), à travers un petit orifice d'une entretoise en téflon, qui sépare le film diélectrique mince de SiO₂ de la phase aqueuse (Figure III.2.3.1.1). La surface diélectrique de silice attire les groupements polaires des molécules de lipides, conduisant ainsi à la formation d'une monocouche lipidique déposée sur une couche d'eau adsorbée, avec les chaînes hydrocarbonées orientées vers les gouttelettes de lipides en excès. À la suite de cette première étape, la cellule CPWR est remplie d'un tampon Tris (10 mM Tris, 0.1 M NaCl, 2 mM EDTA, pH 7.6), ce qui conduit à la formation de la seconde monocouche lipidique et à l'élimination des lipides en excès.

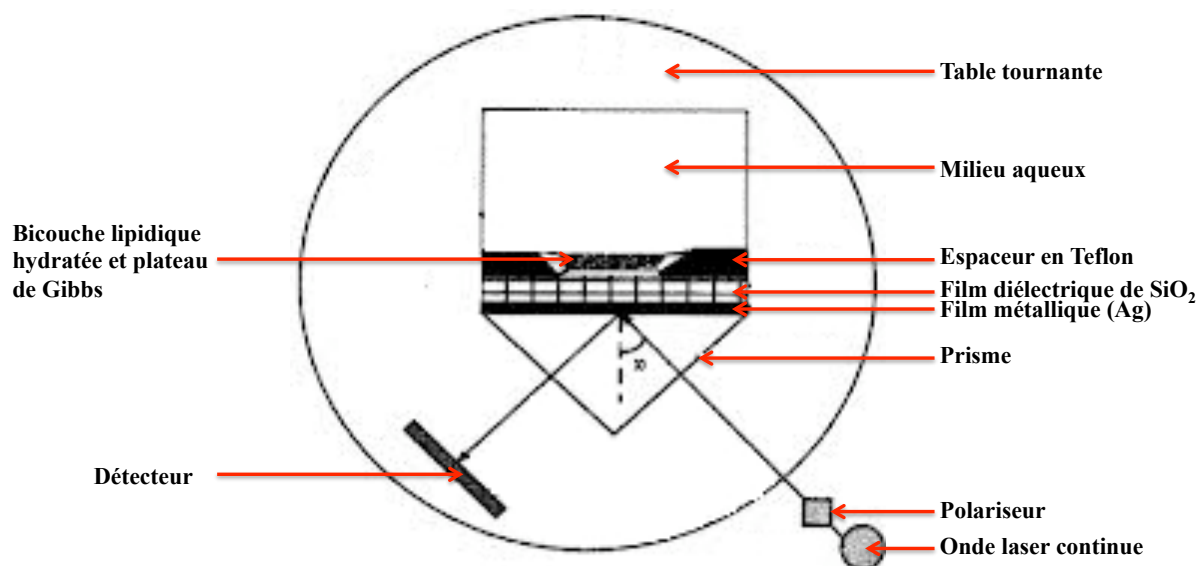


Figure III.2.3.1.1: Vue de côté d'un dispositif expérimental CPWR contenant un prisme en verre revêtu d'une couche d'argent et d'un film diélectrique de SiO₂. La bicouche lipidique hydratée est déposée sur la couche de SiO₂, elle est maintenue en place grâce à une entretoise en téflon via le plateau de Gibbs. Le prisme, le détecteur et le compartiment aqueux du dispositif sont montés sur une table tournante, permettant de faire varier l'angle de 35 à 70°.

Les spectres de polarisation ont été enregistrés et les variations de polarisation p et s mesurées (Figure III.2.3.1.2), afin de vérifier et confirmer que les bicouches lipidiques sont bien formées. Ces valeurs sont du même ordre que celles obtenues par Muller pour les bicouches lipidiques suspendues et confirment que les bicouches lipidiques sont bien formées sur le cristal de PWR²⁷⁰.

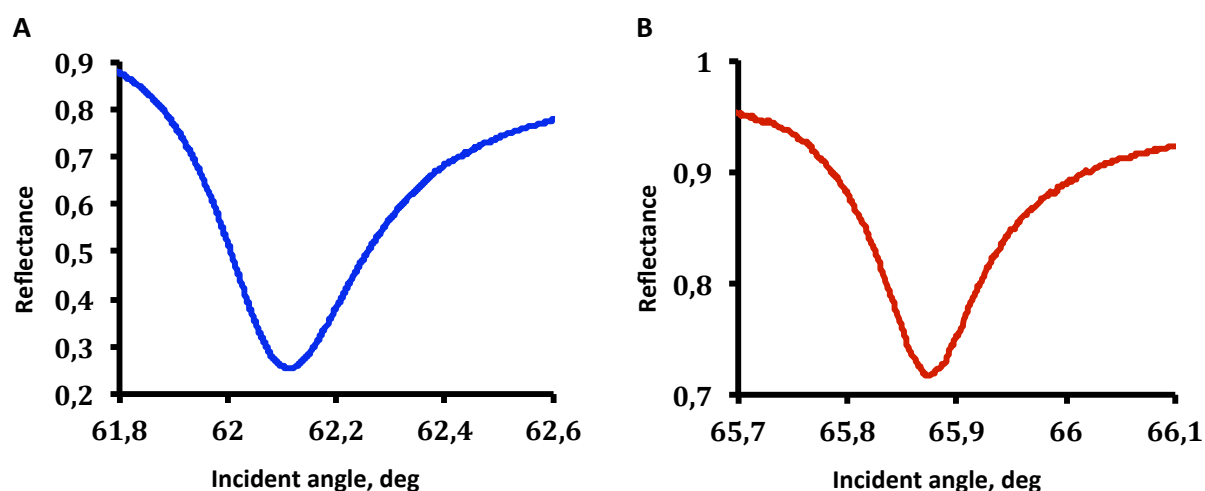


Figure III.2.3.1.2 : Spectres de PWR obtenus pour un cristal couvert d'une bicouche lipidique supportée d'Egg PC dans un tampon Tris (10 mM Tris, 0.1 M NaCl, 2 mM EDTA, pH 7.6). Les spectres sont enregistrés avec une lumière à 543.5 nm en polarisation p (A) ou à 632.8 nm en polarisation s (B). La température du milieu est contrôlée et fixée à $37 \pm 0.2^\circ\text{C}$.

III.2.3.2 Etudes par PWR de l'interaction des peptides avec les bicouches lipidiques d'Egg PC supportées

L'interaction des peptides VP7₆₁, VP7₄₃, VP7₃₆ et VP7₂₃ avec une bicouche d'Egg PC a été étudiée par PWR. Cette technique nous a permis de suivre les modifications de structure et de masse au niveau de la membrane modèle, induites par l'addition des différents peptides à l'état monomère dans la cellule de PWR contenant la bicouche lipidique d'Egg PC. Une gamme de concentrations allant de 100 pM à 200 nM a été utilisée. A chaque concentration, l'équilibre spectral a été atteint avant l'ajout d'une nouvelle quantité de peptide et les spectres de résonance pour les deux polarisations s et p ont été enregistrés.

Les séries de dilutions des différentes solutions de peptide ont été préparées à partir d'une solution mère à 1 mM, mise en solution dans du tampon Tris (10 mM Tris, 0.1 M NaCl, 2 mM EDTA, pH 7.6). Les peptides n'étant pas soluble dans le tampon Tris, 5 % de DMSO

ont été ajoutés. Ce solvant aprotique polaire est souvent utilisé en chimie et en pharmaceutique pour sa capacité à solubiliser de nombreux composés organiques, grâce à ses propriétés de double solvation. En effet le DMSO agit comme un accepteur de liaisons hydrogènes très efficace²⁷¹, par conséquent, il déplace les molécules d'eau à la surface du peptide, formant ainsi des liaisons hydrogènes impliquant les chaînes latérales des résidus polaires ou chargés positivement et son atome d'oxygène. D'autre part, le DMSO réduit l'agrégation du peptide en supprimant les interactions hydrophobes par la formation d'une poche hydrophobe dans laquelle les groupements méthyles du DMSO sont dirigés vers les chaînes latérales hydrophobes des résidus impliqués dans les liaisons hydrophobes²⁷². Il est important à noter que le DMSO pouvant perturber la bicouche lipidique, une expérience de contrôle a été réalisée en utilisant la même concentration de DMSO finale utilisée pour chaque solution de peptide injecté dans la cellule. Les déplacements obtenus lors de l'addition de DMSO ont été soustraits de ceux obtenus lors de l'addition de peptide à la bicouche.

III.2.3.2.1. Interaction du peptide VP7₆₁ avec la bicouche d'Egg PC

La Figure III.2.3.2.1.1 présente les résultats obtenus avant (courbe 1, A et B) et après addition de 200 nM de VP7₆₁ sur la bicouche supportée d'Egg PC (courbe 2, A et B). Le déplacement positif de l'angle de résonance de +14 mdeg et de +13 mdeg respectivement pour les polarisations *p* et *s* après addition du peptide VP7₆₁, indique une augmentation d'indice de réfraction des bicouches d'Egg PC recouvrant le prisme. Cela est la conséquence naturelle de l'augmentation en masse des bicouches liée à l'adsorption du peptide VP7₆₁ sur la bicouche lipidique, entraînant ainsi une réorganisation des lipides.

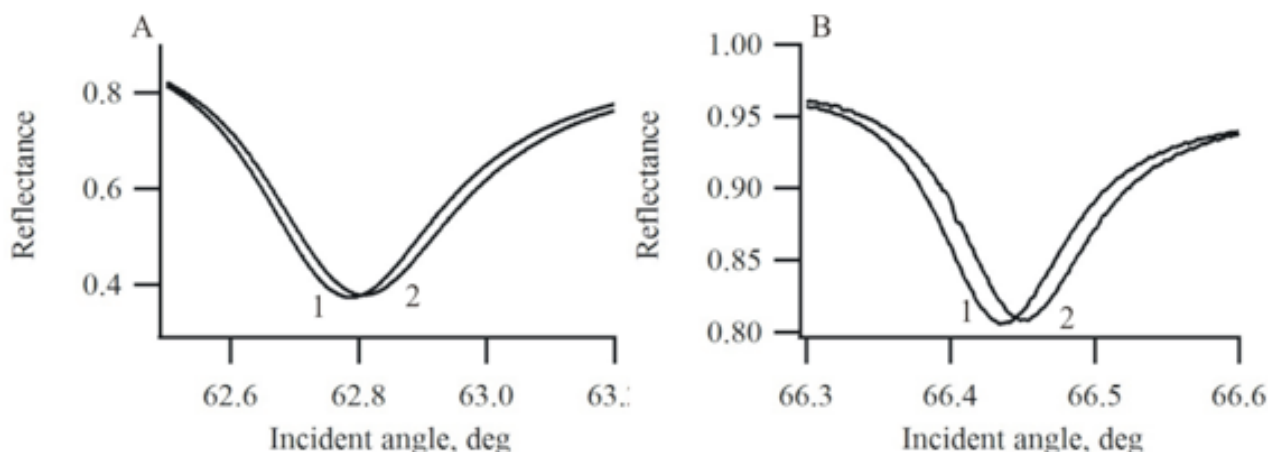


Figure III.2.3.2.1.1: Interaction du peptide VP761 avec les membranes d'Egg PC suivie par PWR. Les spectres PWR A et B correspondant respectivement aux polarisations *p* et *s* sont obtenus pour la bicouche d'Egg PC (1) seule, et après addition du peptide VP7₆₁ (2).

Il est important de garder à l'esprit que le mouvement des lipides dans et hors du plateau de Gibbs est possible. Une diminution de la surface occupée par chaque molécule lipidique peut par exemple, contribuer à une augmentation de la masse des molécules lipidiques.

III.2.3.2.2. Interaction du peptide VP7₄₃ avec la bicouche d'Egg PC

La Figure III.2.3.2.2.1 présente les résultats obtenus avant (courbe 1, A et B) et après addition de 200 nM de VP7₄₃ sur la bicouche supportée d'Egg PC (courbe 2, A et B). Le déplacement négatif de l'angle de résonance de -15 mdeg et de -18 mdeg respectivement pour les polarisations *p* et *s* après addition de 200 nM de VP7₄₃ (courbe 2, A et B) sur la bicouche supportée d'Egg PC (courbe 1, A et B), indique une diminution d'indice de réfraction des bicouches d'Egg PC recouvrant le prisme. Cela est dû à la diminution de masse des bicouches, associée à l'insertion du peptide VP7₄₃ dans la bicouche lipidique, induisant un efflux de lipides vers le plateau de Gibbs. Cela peut être expliqué soit par l'élimination des molécules lipidiques de la surface occupée suite à l'agrégation des peptides, soit à l'augmentation de la fluidité membranaire. Une diminution de masse peut également, être reliée à la formation de pores ou à des déformations membranaires, souvent causées par l'insertion du peptide dans le cœur de la membrane.

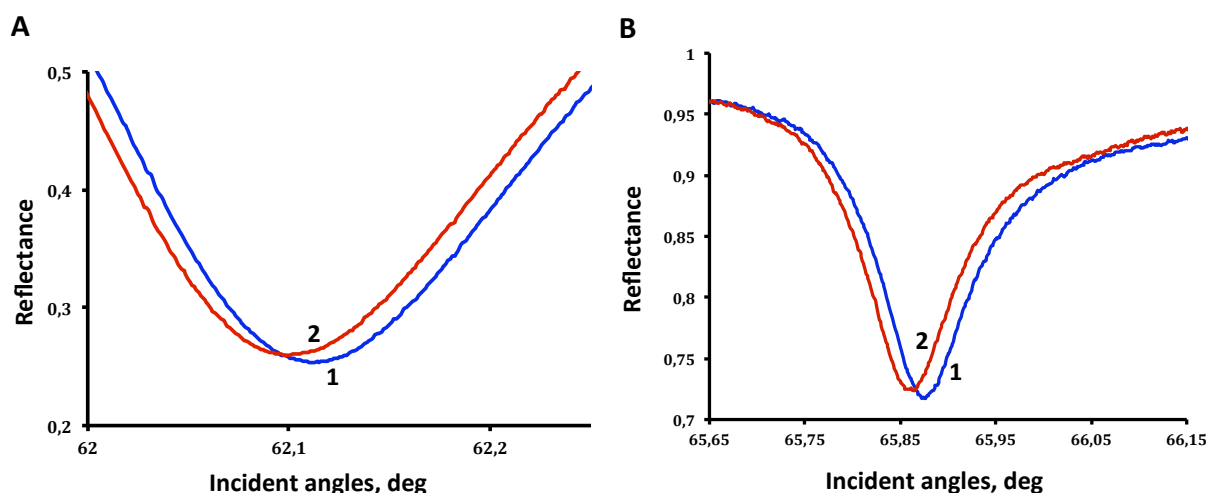


Figure III.2.3.2.2.1: *Interaction peptide-membrane suivie par PWR. Les spectres PWR A et B correspondant respectivement aux polarisations p et s sont obtenus pour la bicouche d'Egg PC (1) seule, et après addition du peptide VP7₄₃ (2).*

III.2.3.2.3. Interaction du peptide VP7₃₆ avec la bicouche d'Egg PC

La Figure III.2.3.2.3.1 présente les résultats obtenus avant (courbe 1, A et B) et après addition de 200 nM du peptide VP7₃₆ sur la bicouche supportée d'Egg PC (courbe 2, A et B). Le déplacement négatif d'angle de résonance de -9 mdeg et de -11 mdeg respectivement pour les polarisations p et s après addition du peptide VP7₃₆, indique une diminution d'indice de réfraction des bicouches d'Egg PC recouvrant le prisme. Cela est la conséquence naturelle de la diminution en masse des bicouches, liée à l'insertion du peptide VP7₃₆ dans la bicouche lipidique, entraînant un efflux de lipides vers le plateau de Gibbs à la suite soit d'une augmentation de la fluidité membranaire, soit de l'élimination de molécules lipidiques de la surface occupée suite à l'agrégation des peptide. Une diminution de masse peut également, résulter de la formation de pores ou de déformations membranaires, souvent causée par l'insertion du peptide dans le cœur de la membrane²⁷³.

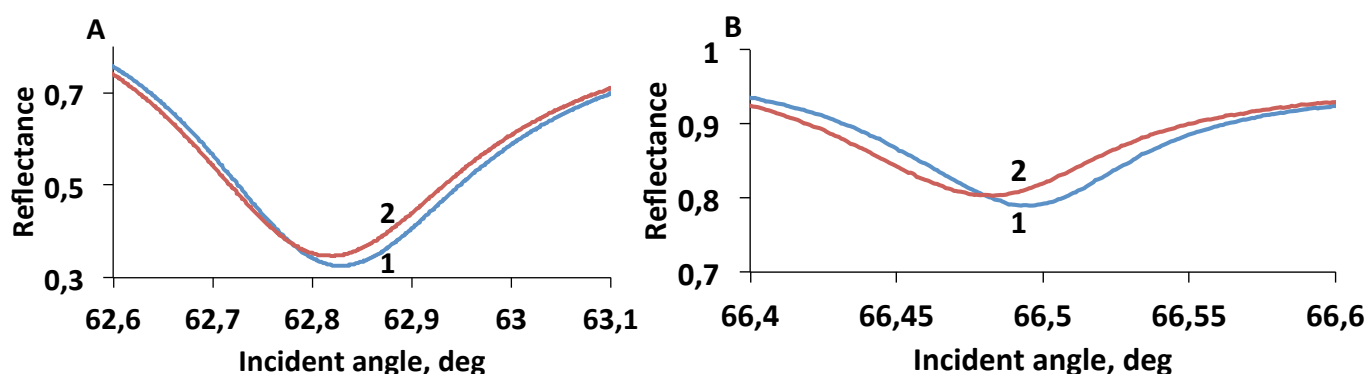


Figure III.2.3.2.3.1 : Interaction du peptide VP7₃₆ avec les membranes d'Egg PC suivie par PWR. Les spectres PWR A et B correspondant respectivement aux polarisations *p* et *s* sont obtenus pour la bicouche d'Egg PC (1) seule, et après addition du peptide VP7₃₆ (2)

III.2.3.2.4. Interaction du peptide VP7₂₃ avec la bicouche d'Egg PC

L'insertion du peptide VP7₂₃ dans la bicouche lipidique, entraîne un efflux plus important de lipides vers le plateau de Gibbs à la suite, soit d'une augmentation de la fluidité membranaire, soit de l'élimination des molécules lipidiques de la surface occupée suite à l'agrégation des peptides. Ces conclusions résultent du déplacement négatif d'angle de résonance de -26 mdeg et de -15 mdeg respectivement pour les polarisations *p* et *s*, observé après addition de 200 nM de VP7₂₃ sur la bicouche supportée d'Egg PC (Figure III.2.3.2.4.1, courbe 2, A et B)

De plus, il est important à noter qu'une diminution de masse peut également, résulter de la formation de pores ou de déformations membranaires, souvent causée par l'insertion du peptide au cœur de la membrane.

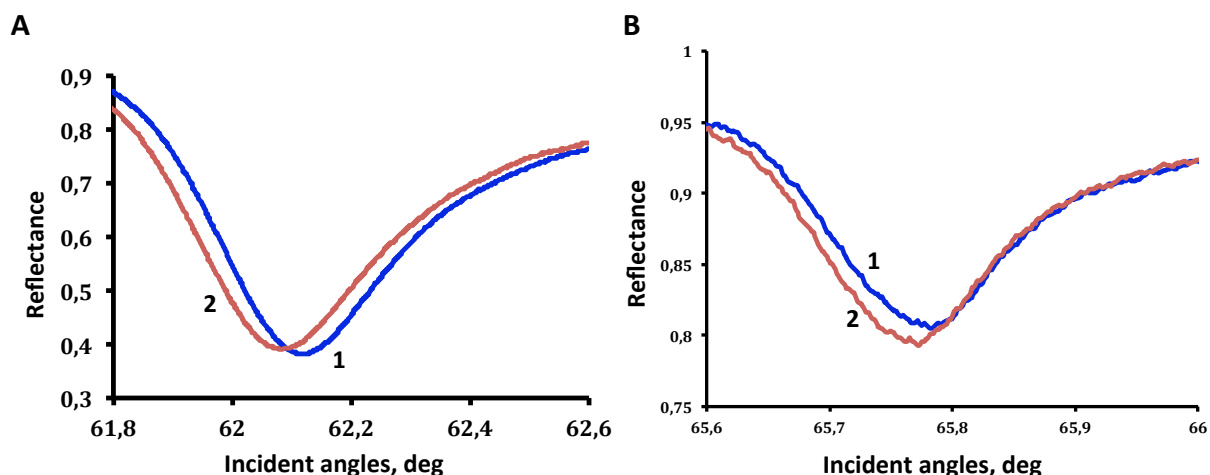


Figure III.2.3.2.4.1: Interaction du peptide-membrane suivie par PWR. Les spectres PWR A et B correspondant respectivement aux polarisations *p* et *s* obtenus pour la bicouche d'Egg PC (1) seule, et après addition du peptide VP7₂₃ (2)

Les modifications spectrales induites par les différents peptides sont irréversibles après lavage des cellules de PWR en téflon et comparables à d'autres études effectuées sur des peptides membranaires^{274,275}. En outre ces changements sont très similaires pour les deux polarisation *s* et *p*, ce qui indique une accumulation plutôt latérale des peptides (Figure III.2.3.2.1. A). Une accumulation verticale aurait conduit à une grande variation du spectre de polarisation *p* par rapport à celui de la polarisation *s* (Figure III.2.3.2.1. B).

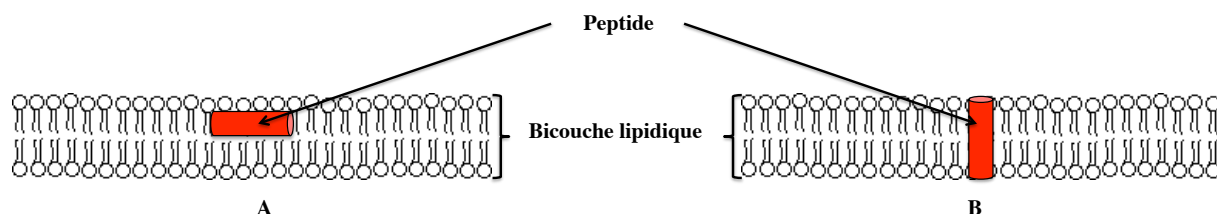


Figure III.2.3.2.1: Adsorption des peptide sur une bicouche lipidique. A) accumulation latérale, B) accumulation verticale

Une analyse graphique, consistant à représenter dans un repère orthogonal (Δs - Δp) les deux axes, de masse (Δm) et d'anisotropie (Δstr) (Figure III.2.3.2.2) en se basant sur le facteur de sensibilité de l'appareil (δf)²³², nous a permis de déterminer les changements de masse ou de structure lors de l'interaction des peptides avec les bicouches lipidiques.

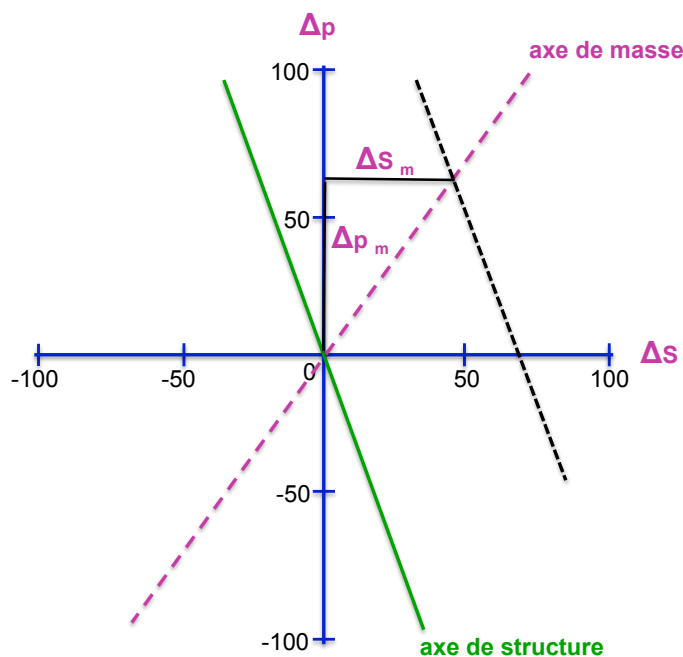


Figure III.2.3.2.2: Analyse graphique de changements en masse et en structure des couches à l'interface du prisme (Salamon et Tollin. 2004)

Les variations des spectres observées après addition des différentes concentrations en peptide, sont résumées dans le tableau III.2.3.2.2. Ces résultats montrent que les décalages spectraux sont liés majoritairement à des changements de masse et seulement 20%, ou moins sont liés à des modifications de structure.

	VP7 ₆₁		VP7 ₄₃		VP7 ₃₆		VP7 ₂₃	
Changement en masse et en structure (%)	Masse (Δm)	Structure (Δs)	Masse (Δm)	Structure (Δs)	Masse (Δm)	Structure (Δs)	Masse (Δm)	Structure (Δs)
Bicouche d'Egg PC à 8 mg/mL	90	10	83	17	83	17	80	20

Tableau III.2.3.2.2: Tableau récapitulatif des changements en masse et en structure induits par l'addition des concentrations croissantes en peptides.

III.2.3.3 Détermination des constantes d'affinité des peptides dérivés de la glycoprotéine VP7 pour les bicouches d'Egg PC par PWR

Les constantes d'affinité des peptides dérivés de la glycoprotéine VP7 pour les bicouches d'Egg PC ont été obtenues par analyse des courbes de saturation hyperbolique, qui représentent la variation de l'angle de résonance de la polarisation *p* ou *s* en fonction de la concentration en peptide injectée (Figure III.2.3.3.1). Des concentrations croissantes de peptide de 100 pM à 200 nM ont été ajoutées dans la cellule de PWR, contenant la bicouche lipidique.

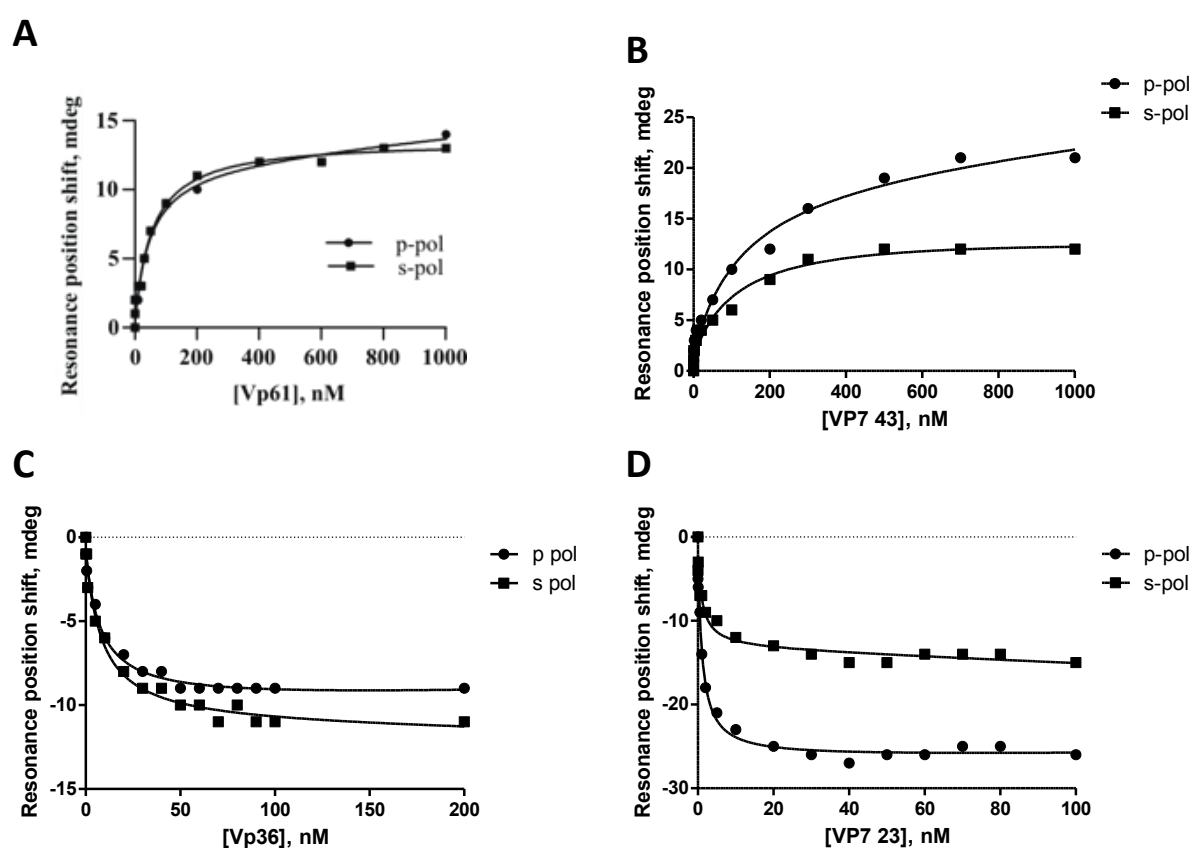


Figure III.2.3.3.1: Courbe hyperbolique d'interaction des peptides VP7₆₁, VP7₄₃, VP7₃₆ et VP7₂₃ avec la bicouche d'Egg PC. Le déplacement positif ou négatif d'angle de résonance obtenu en polarisation *p* et *s*, est lié à l'addition des concentrations croissantes en peptide VP7₆₁ (A), VP7₄₃ (B), VP7₃₆ (C) et VP7₂₃ (D) respectivement.

Lors de l'interaction du peptide avec la membrane d'autres phénomènes contraignants se produisent simultanément, tels que la réorganisation membranaire et la solvation, en conséquence, les constantes de dissociation obtenues K_d sont des constantes apparentes.

Les valeurs des constantes de dissociation associées à chaque peptide en interaction avec la bicouche d'Egg PC sont reportées dans le tableau III.2.3.3.1.

	Peptides dérivés de la glycoprotéine VP7 après maturation par la trypsine			
	VP7 ₆₁	VP7 ₄₃	VP7 ₃₆	VP7 ₂₃
Constantes de dissociation apparentes K_d (nM)	95	52	8	1.2

Tableau III.2.3.3.1: Constante de dissociation apparente des différents peptides. Ces constantes proviennent de la combinaison entre l'affinité des peptides et leur capacité à perturber les membranes (bicouche d'Egg PC).

La comparaison entre les valeurs des constantes de dissociations déterminées pour chaque peptide, indique clairement que le peptide VP7₂₃ présente la plus forte affinité pour les bicouches d'Egg PC. Ces données confortent les résultats obtenus dans le paragraphe III.2.2.2 dans lequel nous avons montré que le domaine minimum d'interaction, présentant la plus forte affinité pour les membranes correspondait au peptide VP7₂₃ et contenant le domaine prédit en hélice membranaire.

III.2.3.4 L'effet du cholestérol sur l'efficacité d'interaction des peptides avec les bicouches supportées à la surface du cristal de PWR

L'effet du cholestérol sur l'interaction des peptides dérivés de VP7 (VP7₆₁, VP7₄₃, VP7₃₆ et VP7₂₃) avec une bicouche lipidique a été étudié par PWR. Les bicouches lipidiques d'Egg PC-Cholestérol (Egg PC 80 mol%, Cholestérol 20 mol%) ont été préparées telles que cela a été décrit dans la partie III.2.3.1. Nous avons suivi les modifications de structures et de masses au niveau de la membrane modèle, induites par l'addition des différentes concentrations de peptides VP7₆₁, VP7₄₃, VP7₃₆ ou VP7₂₃, s'étalant de 100 pM à 200 nM, à l'état monomère dans la cellule de PWR contenant la bicouche lipidique d'Egg PC-Cholestérol. Les spectres de résonance pour les deux polarisations *s* et *p* ont été enregistrés.

Les constantes d'affinités des peptides pour les bicouches d'Egg PC-Cholestérol ont été obtenues par l'analyse de la courbe respective de variation d'angle de résonance des polarisations *p* ou *s* en fonction de la concentration en peptide injectée. Ces constantes obtenues sont des constantes de dissociation apparente, K_d , dont les valeurs sont portées dans le tableau III.2.3.4.1.

	Peptides dérivés de la glycoprotéine VP7 par maturation à la trypsine			
	VP7 ₆₁	VP7 ₄₃	VP7 ₃₆	VP7 ₂₃
Constantes de dissociation apparentes K_d (nM)	330	127	65	23

Tableau III.2.3.4.1: Constante de dissociation apparente des différents peptides : Ces constantes proviennent de la combinaison entre l'affinité des peptides pour les bicouches d'Egg PC-Cholestérol et leur capacité à les perturber.

Comme indiqué dans le tableau III.2.3.4.1, la présence de cholestérol induit une diminution de l'affinité des peptides pour les membranes et cet effet est le plus important pour VP7₂₃. Cette variation peut résulter de la diminution de fluidité membranaire essentielle pour l'interaction du peptide avec les membranes lipidiques.

Des résultats similaires ont été observés par différents groupes, concernant l'effet du cholestérol sur la perméabilisation de membranes modèles (eucaryotes et procaryotes) induite par des peptides antimicrobiens^{260,276-281}. Il a été décrit dans la littérature, que le cholestérol entraîne une augmentation de la cohésion et de la rigidité des membranes^{263,282}, il en résulte ainsi une perte de la flexibilité membranaire, probablement essentielle pour l'interaction du peptide avec la membrane. Ramamoorthy et al, ont fourni des informations à haute résolution par RMN sur l'importance de la flexibilité des membranes et le rôle du cholestérol dans l'inhibition de l'activité du paradaxine, un peptide antimicrobien isolé de la sole²⁸³. Ils ont montré que la présence du cholestérol réduit l'angle d'inclinaison de l'hélice C-terminale amphipathique du paradaxine par rapport à la bicouche normale, ce qui conduit à une perte de l'efficacité du peptide à déstabiliser les membranes, tel que cela est indiqué dans la Figure III.2.3.4.1.

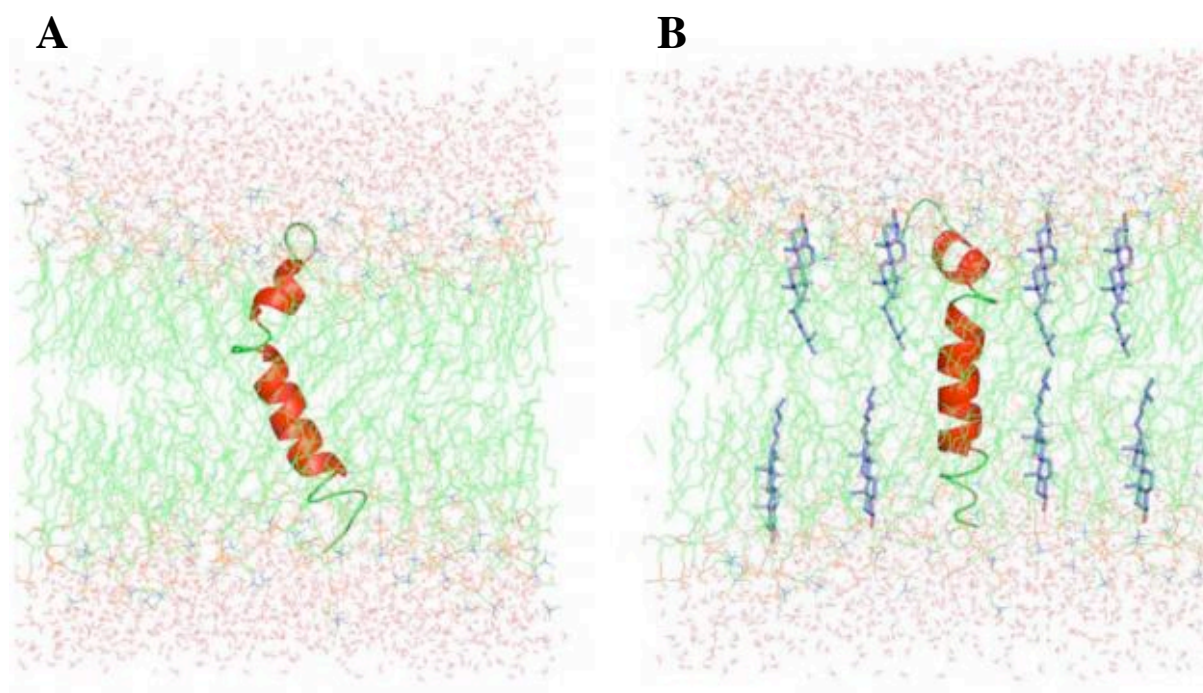


Figure III.2.3.4.1 : Modèle décrivant le dynamique membranaire et l'orientation de l'hélice amphipathique de paradoxine en absence (A) et présence (B) de Cholestérol par Ramamoorthy et al., 2010.

III.2.3.5 Contribution électrostatique sur l'efficacité des peptides VP7₆₁ et VP7₃₆ à déstabiliser les membranes modèles.

Le didécyldiméthylammonium bromide (DDAB) a été utilisé dans le cadre de cette étude dans le but d'introduire des charges positives dans la membrane. Nous voulions vérifier l'importance et l'implication des résidus chargés positivement constituant la face hydrophile des hélices amphipathiques des peptides VP7₆₁ et VP7₃₆, pendant les premières étapes de l'interaction avec les membranes. Les bicouches lipidiques d'Egg PC-DDAB (Egg PC 80 mol%, Didocyldiméthyl amonium bromide, DDAB 20 mol%) ont été préparées telles que cela a été décrit précédemment. Nous avons suivi au niveau de la membrane modèle, les modifications induites par l'addition des différentes concentrations de solutions peptidiques de VP7₆₁ ou de VP7₃₆, variant de 100 pM à 200 nM, à l'état monomère dans la cellule de PWR contenant la bicouche lipidique. Les spectres de résonance pour les deux polarisations s et p ont été enregistrés.

Le DDAB a été utilisé dans des travaux précédents menés par Méchin et al, afin de mettre en évidence le rôle bactéricide de la composition lipidique et l'adaptation des *Pseudomonas aeruginosa* au DDAB²⁸⁴.

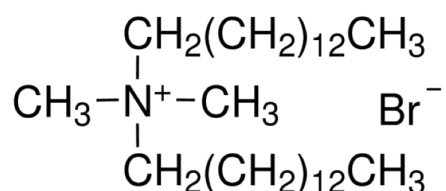


Figure III.2.3.5.1: Formule chimique du didécyl diméthylammonium bromide (DDAB) (référence Sigma Aldrich: 40225).

Les constantes d'affinités des peptides VP7₆₁ et VP7₃₆ pour les bicouches d'Egg PC-DDAB ont été obtenues par l'analyse des courbes de saturation hyperbolique, qui représente la variation d'angle de résonance de la polarisation *p* ou *s* en fonction de la concentration en peptide injectée.

Il est intéressant de noter que lors de l'interaction du peptide avec la membrane d'autres phénomènes contraignants se produisent simultanément, tels que la réorganisation membranaire et la solvatation, les constantes obtenues sont donc des constantes apparentes K_d, dont les valeurs sont portées dans le tableau III.2.3.5.1.

La hausse considérable de la valeur de K_d apparente en présence de lipides chargés positivement, peut résulter de la répulsion électrostatique entre les lipides et le peptide, compte tenu du grand nombre d'acides aminés chargés positivement présents dans chaque peptide ayant un point isoélectrique d'environ 10 (Figure III.1.4.1, paragraphe III.1.4, partie III.1, chapitre III: Résultats). Il existe de ce fait une très forte corrélation entre l'activité des peptides et leur charge nette comme cela a été observé dans le cas de peptides antimicrobiens²⁸⁵ tels que la Magainine 2.

	Peptides dérivés de la maturation de la glycoprotéine VP7 par la trypsine	
	VP7 ₆₁	VP7 ₃₆
Constante de dissociation apparente Kd (nM)	157	250

Tableau III.2.3.5.1: Constante de dissociation apparente des peptides VP7₆₁ et VP7₃₆ : Ces constantes proviennent de la combinaison entre l'affinité des peptides pour les membranes (*bicouche d'Egg PC-DDAB*) et leur capacité à les perturber.

Il est donc probable que tel que cela a été reporté dans de nombreux travaux, la première étape du mécanisme d'action de ces peptides destabilisateurs de membranes soit une interaction électrostatique entre le peptide et la membrane^{188,199,286,287}, comme cela est illustré dans la Figure III.2.3.5.2.

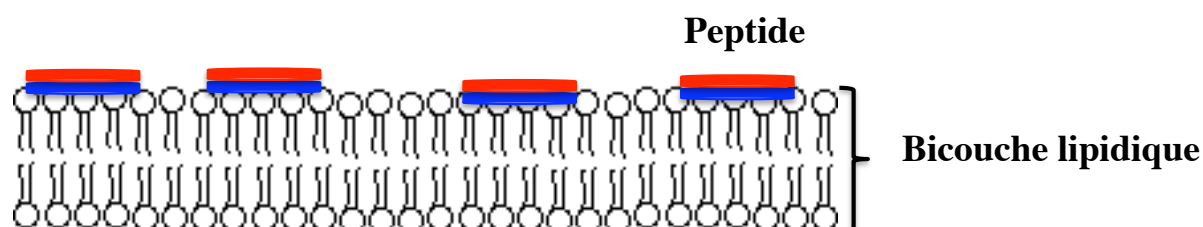


Figure III.2.3.5.2: Schéma représentatif de l'étape initiale du mécanisme d'action au niveau membranaire des peptides. Le peptide est représenté ici schématiquement par un cylindre possédant une face hydrophobe (rouge) et une face hydrophile (bleu).

III.2.4. Discussion et conclusions

Nous pouvons, au vu de ces résultats, faire des observations très similaires à celles effectuées pour les expériences précédentes. En effet, l'efficacité des peptides dérivés de la glycoprotéine VP7 après maturation par la trypsine (VP7₆₁, VP7₄₃, VP7₃₆, VP7₂₃) à destabiliser les membranes est fonction de la composition lipidique de la membrane. La diminution de la constante de dissociation de l'interaction peptide-membrane induite par la

présence du cholestérol, est liée à la perte de la flexibilité membranaire, probablement essentielle pour l'interaction du peptide avec la membrane. En effet les molécules de cholestérol apolaires reposent sur une couverture polaire assurée par les têtes polaires des phospholipides, afin de réduire l'énergie défavorable provenant des répulsions entre molécules d'eau et de cholestérol. Ce comportement physique des molécules de cholestérol vis à vis de l'eau, appelé « modèle parapluie »²⁸⁸, est illustré dans la Figure I.3.1. Les propriétés physico-chimiques du cholestérol expliquent l'effet de condensation de ce dernier et l'augmentation du paramètre d'ordre au niveau des chaînes alkyles, entraînant une augmentation de l'épaisseur et de la rigidité des membranes.

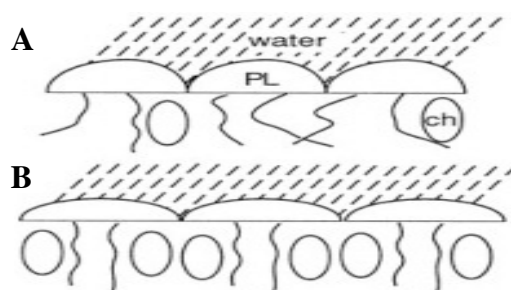


Figure I.3.1 : Modèle parapluie : proposé par Huang et al, 1999, illustrant la solubilité du cholestérol dans la bicouche lipidique. A, dans une bicouche lipidique les têtes polaires agissent comme des parapluies, protégeant de l'eau la partie apolaire des molécules de cholestérol. B, lorsque la concentration en cholestérol augmente, les chaînes alkyles deviennent moins flexibles et les têtes polaires sont étirées pour fournir une couverture au nombre croissant de cholestérol.

Lors de l'interaction du peptide avec la membrane chargée positivement, nous avons observé une baisse considérable de la constante de dissociation apparente K_d . Compte tenu de la quantité d'acides aminés chargés positivement présents dans chaque peptide, nous avons expliqué ces résultats par des répulsions électrostatiques entre les lipides et le peptide. Enfin, nous avons proposé ainsi une première étape du mécanisme d'action des peptides sur les membranes, qui nécessite une interaction électrostatique entre la face hydrophile du peptide et les têtes polaires des lipides. Cette étape rend compte des changements très similaires observés dans la partie I.3.2, concernant le déplacement des deux polarisation s et p dans les spectres de PWR après addition de peptide. Cela va plutôt dans le sens d'une accumulation latérale des peptides sur la membrane, pendant la première étape d'interaction.

L'analyse graphique des résultats de PWR effectuée en se basant sur la variation des spectres observés après addition des différentes concentrations en peptide, montre que les

perturbations au niveau des membranes sont liées majoritairement à des changements de masse et seulement moins de 20% sont liés à des modifications de structure.

Partie III

**Caractérisation structurale du domaine minimum d'interaction
avec les membranes, dérivé de la glycoprotéine VP7 après
maturation par la trypsine et étude des peptides mutants**

III.3 Caractérisation structurale du domaine minimum d'interaction avec les membranes, dérivé de la glycoprotéine VP7 après maturation par la trypsine

III.3.1. Objectif

Nous avons pu mettre en évidence les nombreuses propriétés des peptides dérivés du domaine C-terminal de la glycoprotéine VP7, après maturation par la trypsine. Comme nous l'avons montré précédemment, ces peptides comportant un domaine prédit en hélice α amphipathique induisent la perméabilisation des membranes. De plus, les tests de perméabilisation effectués sur les LUVs d'Egg PC, ainsi que les expériences de PWR, nous ont permis de montrer que VP7₂₃ est le domaine minimum d'interaction avec les membranes et est le plus actif pour la déstabilisation membranaire. Il apparaît donc maintenant essentiel de comprendre plus finement la nature des interactions entre les membranes et ces peptides, afin de proposer un mécanisme permettant de mieux comprendre les effets observés sur les membranes biologiques. Dans ce but, il est important de déterminer la structure 3D qu'adopte le domaine minimum d'interaction avec les membranes dans des environnements biologiquement et physiologiquement proches des membranes.

La structure de la glycoprotéine VP7 native a déjà fait l'objet d'études approfondies et les données obtenues sont décrites en détail dans l'introduction. De ce fait nous avons mis en place un certain nombre d'études structurales, afin d'élucider les relations entre la structure et la fonction de VP7₂₃, domaine minimum d'interaction avec les membranes.

Pour mener à bien ce projet, trois expériences ont été mises en place. La première nous a permis de mettre en évidence les éléments de structure secondaire qu'adopte le peptide en présence de petites vésicules unilamellaires (SUV) d'Egg PC et d'extraits cellulaires de foie. Cette expérience a été menée par dichroïsme circulaire, afin d'expliquer les différences d'affinité du peptide pour les membranes modèles observées lors des tests de perméabilisation. La seconde expérience mise en place avait pour but de déterminer les conditions d'études optimales, permettant l'obtention de la structure 3D active du peptide VP7₂₃ à partir de contraintes RMN. Enfin, nous avons déterminé l'effet de 2 mutations dans ce peptide sur sa structure et sur son activité de perméabilisation lors de son interaction avec les membranes.

Bien que nous ayons démontré que le peptide VP7₂₃ constituait le domaine minimum d'interaction avec les membranes, les structures de l'ensemble des peptides dérivés de la glycoprotéine VP7 par clivage tryptique ont été déterminées (Chapitre V: Annexe, paragraphe

V.2.2) afin de corrélérer leur activité à leur structure. Cependant dans ce chapitre nous nous sommes focalisés uniquement sur le peptide VP7₂₃ ainsi que sur ses mutants.

III.3.2. Détermination des éléments de structures secondaires présents dans le domaine minimum d'interaction, VP7₂₃, avec les membranes modèles par dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire (CD) est une technique spectroscopique rapide et simple qui permet d'analyser les structures secondaires présentes dans les protéines et peptides en solution. Il est ainsi possible d'évaluer la conformation du peptide VP7₂₃ dans différentes conditions de pH, de sels, de concentration et sa structuration dans différents environnements mimant la membrane.

Dans un premier temps, nous avons enregistré des spectres de dichroïsme circulaire dans les SUVs d'Egg PC et d'extrait cellulaire total de foie, afin d'identifier les structures secondaires que peut adopter le peptide VP7₂₃ dans différentes conditions. Cette étude nous a semblé être importante, compte tenu des différences de vitesse de libération de la 6-CF observée en fonction de la composition lipidique des SUVs. Nous avons étudié par CD la structuration du peptide dans des SUVs ainsi qu'en présence de micelles de DPC.

III.3.2.1 Etude de la structuration par dichroïsme circulaire dans les SUVs

Dans le cadre de nos études, les spectres ont été enregistrés à l'aide d'un spectropolarimètre Jobin-Yvon model C8 et une cuve de 0.1 mm d'épaisseur a été utilisée.. Les mesures ont été effectuées à température ambiante dans des SUVs d'Egg PC et des SUVs d'extrait cellulaire total de foie. Les vésicules ont été préparées selon le protocole décrit dans le paragraphe II.1.7.5 (Chapitre II: Matériels et Méthodes). Pour chaque condition, 600 µL d'une solution de 1 mg/mL de SUV ont été préparés, 300 µL de chacune de ces solutions ont été utilisés pour dissoudre 0.1 mg du peptide VP7₂₃, et le reste de la solution a été utilisé pour enregistrer le spectre de référence (blanc).

Les spectres de dichroïsme circulaire correspondant au domaine minimum d'interaction avec les membranes, VP7₂₃, sont représentés sur la Figure III.3.2.1.1. Respectivement dans des SUVs d'Egg PC (A) et des SUVs d'extrait cellulaire de foie (B). Les résultats ont été exprimés en unité d'ellipticité molaire $[\Theta]$ (deg cm² dmol⁻¹) à partir de l'équation 1, pour une masse moyenne d'acides aminés égale à 128.11 Da.

$$[\Theta] = \frac{(\theta * 100 * MRW)}{(C * l)} \quad Eq\ 1$$

θ , est l'ellipticité mesurée en degrés.

MRW, est masse moyenne des résidus.

C, la concentration en peptide utilisée pour cette étude, exprimée en mg/mL.

l, est la longueur du trajet optique en cm.

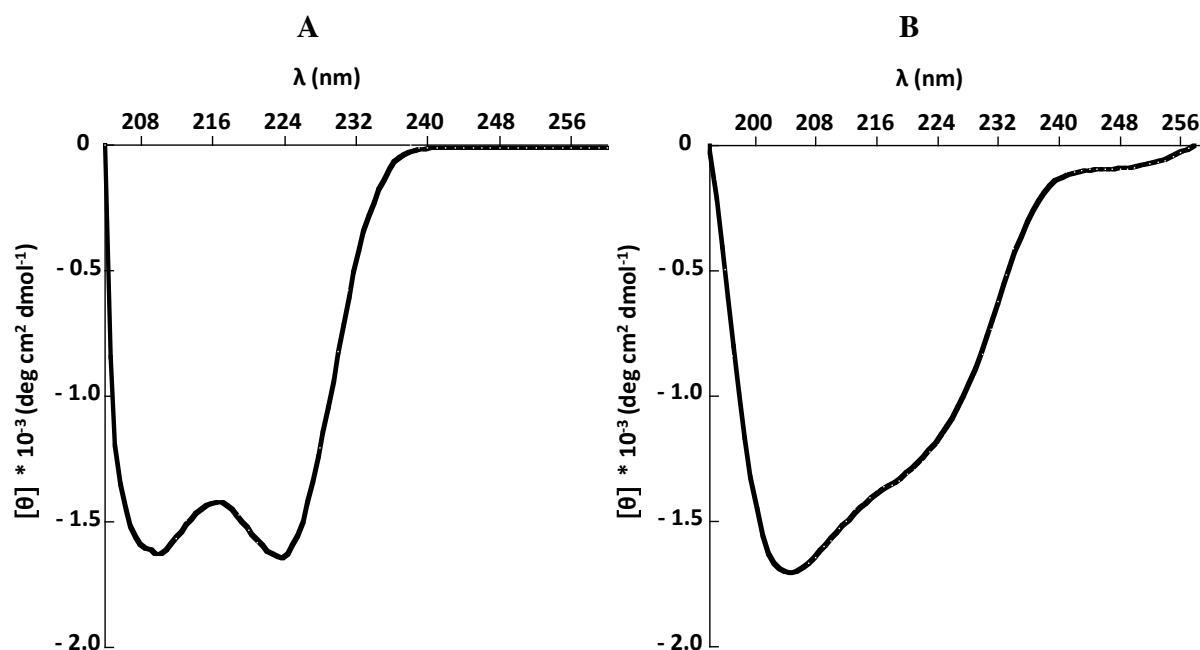


Figure III.3.2.1.1: Spectres de dichroïsme circulaire mettant en évidence les structures secondaires qu'adopte le peptide VP7₂₃, domaine minimum d'interaction avec les membranes. A. en présence des SUVs d'Egg PC. B. en présence des SUVs d'extrait cellulaire total de foie. Le rapport peptide/lipide est égal à 1/20 dans les deux conditions de l'étude.

L'analyse des spectres met en évidence une structuration du peptide VP7₂₃ en hélice α faiblement ordonnée (Figure III.3.2.1.1. B) en présence des SUVs d'extrait cellulaire total de foie. En effet deux minima (206 nm et 223 nm) typiques des structures secondaires en hélice α sont observés. L'utilisation d'un mélange lipidique constitué uniquement de L- α -phosphatidylcholine (Egg PC) entraîne un changement conformationnel, qui se traduit par une organisation complète du peptide en hélice α (Figure III.3.2.1.1. A).

Ces expériences indiquent que le peptide VP7₂₃, adopte des structures différentes selon la nature des lipides utilisés. Des résultats similaires ont été observés par Abrunhosa²⁸⁹ dont

les travaux mettant en évidence l'effet de la composition lipidique sur les structures secondaires qu'adoptent les cecropin A et sur leur capacité à interagir avec les membranes.

D'autres spectres de dichroïsme circulaire du peptide à 30 μM ont été enregistrés en présence de SUVs d'Egg PC ou d'extrait cellulaire du foie, avec un rapport peptide/lipide de 1/100, en préparant les échantillons selon un protocole différent afin de minimiser l'agrégation du peptide. Le peptide a été mis en solution dans un mélange méthanol/chloroforme (1/1 : 50/50 μL) et un volume adéquat de cette solution contenant VP7₂₃ a été ajouté dans une solution de lipide eux-mêmes solubilisés dans un mélange méthanol/chloroforme (1/1 : 100/100 μL). Les solvants organiques ont ensuite été évaporés à sec à l'aide d'un jet d'argon pour former un film lipidique, renfermant le peptide, à la surface d'un tube en verre à bout arrondi, placé sous vide pendant 1 heure, afin d'éliminer toute trace de méthanol et de chloroforme. Ce dernier a été réhydraté avec de l'eau et le pH a été mesuré. Les résultats obtenus sont en accord avec les résultats précédents illustrés dans la Figure III.3.2.1.1 et laissent penser que le peptide était déjà solubilisé dans les conditions précédentes.

La deuxième information fournie par ces spectres concerne le pourcentage d'ellipticité. Les pourcentages d'hélice α ont été déterminés en mesurant le rapport des intensités à 223 nm et à 208 nm et les résultats sont résumés dans le tableau III.3.2.1.1. Nous avons également utilisé l'équation de Chen et al²⁹⁰, donnée ci-dessous mais les résultats obtenus n'étaient pas cohérents.

$$\mathcal{F}_H = \frac{[\Theta] + 2340}{30.300} \quad \text{Eq 2}$$

Conditions expérimentales	Pourcentage d'hélice α	$[\Theta]_{208}$	$[\Theta]_{220}$
En présence de SUVs d'Egg PC	98 %	1.653	1.679
En présence de SUVs d'extrait cellulaire total de foie	77 %	1.643	1.262

Tableau III.3.2.1.1: Pourcentage d'hélice α obtenu en présence des SUVs d'Egg PC. et en présence de SUVs d'extrait cellulaire total de foie.

L'augmentation de l'ellipticité et le décalage spectral des deux minima (de 4 nm ou 2 nm) observés, sont liés à la stabilité de la structure en présence des SUVs d'Egg PC. Ces résultats mettent en évidence que le peptide VP7₂₃ adopte une structure en hélice α dans une solution de SUVs constituée de 100% d'Egg PC. La substitution des phosphatidylcholines par d'autres lipides entraîne une diminution de la stabilité de la structure déjà existante.

En conclusion, il semble que même si le peptide adopte une structure en hélice alpha dans un milieu mimant l'hydrophobicité des membranes, cette structuration semble directement dépendante du milieu en général et de la composition en lipides des membranes en particulier. Compte tenu des tests de perméabilisation et des résultats de dichroïsme circulaire nous pensons que la structure active du peptide VP7₂₃ montrant une grande capacité à perméabiliser les membranes correspond à une hélice α .

III.3.3. Etude structurale par résonance magnétique nucléaire (RMN)

III.3.3.1 Détermination des conditions de mise en solution du peptide VP7₂₃, pour l'étude RMN

La mise en solution du fragment C-terminal de la glycoprotéine VP7 a posé beaucoup de problèmes car ce peptide présentait une faible solubilité dans l'eau pure aux conditions d'étude pour la RMN (1 mM). Après plusieurs tentatives de mise en solution nous nous sommes basés sur les résultats préliminaires de prédiction de structure secondaire par dichroïsme circulaire, mettant en évidence une structuration en hélice α . Il nous a semblé important de déterminer les conditions de mise en solution du peptide permettant de favoriser sa structuration en hélice α , afin d'étudier le mécanisme par lequel ce peptide induit la perméabilisation membranaire.

Dans un premier temps, nous avons effectué une recherche bibliographique, afin d'étudier les différents environnements, biologiquement et physiologiquement proches des membranes. permettant l'étude de la structure du peptide VP7₂₃. Cette première étape nous a conduit à choisir deux milieux différents utilisés en routine pour mimer les membranes. Le premier correspond à un mélange de CD₃OH/CDCl₃ (1/1)^{291,292} et le second milieu couramment utilisé pour solubiliser les protéines membranaires, est constitué par des micelles de DPC (dodécylphosphocholine)^{250,293-295}. Malgré le fait que les systèmes micellaires constituent un modèle plutôt éloigné de la bicouche des biomembranes, nous avons utilisé le DPC en nous basant sur deux critères. Le premier est dû à la présence de la tête zwitterionique

des DPC propre à mimer la surface membranaire et le second est lié à la taille des chaînes aliphatiques qui favorisent l'obtention de micelles dont la taille est suffisamment grande pour permettre une bonne structuration et stabilisation du peptide. De plus, contrairement aux SUVs et aux bicelles, la taille des micelles est suffisamment petite pour restreindre la taille des complexes peptide-micelle, et réduire ainsi la diffusion de spin lors de l'étude RMN²⁹⁶.

Une étude préliminaire permettant d'évaluer les structures secondaires du peptide dans les micelles de DPC a été entreprise par dichroïsme circulaire. Dans ce but, les micelles ont été préparées par solubilisation de 19.5 mg de DPC-d₃₈ dans 500 μ L H₂O/D₂O (90% : 10%), permettant ainsi l'obtention d'une solution à 100 mM, dont la concentration finale est supérieure à la concentration micellaire critique (CMC = 1.1 mM) du DPC. Cette solution a été utilisée pour dissoudre 1.47 mg du peptide VP7₂₃. Après homogénéisation de l'échantillon le pH a été ajusté afin d'obtenir une solution à pH 3.0. Seulement 9 μ L de cette solution ont été utilisés et le volume a été complété jusqu'à 300 μ L par addition d'eau, afin d'obtenir une solution finale de micelles à 3 mM en présence de 30 μ M de peptide. Cette solution a été utilisée pour enregistrer les expériences de dichroïsme circulaire et le reste de la solution a été utilisé pour la préparation de l'échantillon pour l'étude structurale par RMN.

Il apparaît que le peptide VP7₂₃ adopte une conformation en hélice α dans nos conditions d'étude (DPC), pour un rapport peptide/lipide égal à 1/100, qui est une condition expérimentale identique aux conditions d'étude par RMN. D'après les résultats obtenus (Figure III.3.3.1.1), cette structure en hélice α est caractérisée par la présence des deux minima (210 nm et 223 nm) et deux maxima (196 nm et 216 nm).

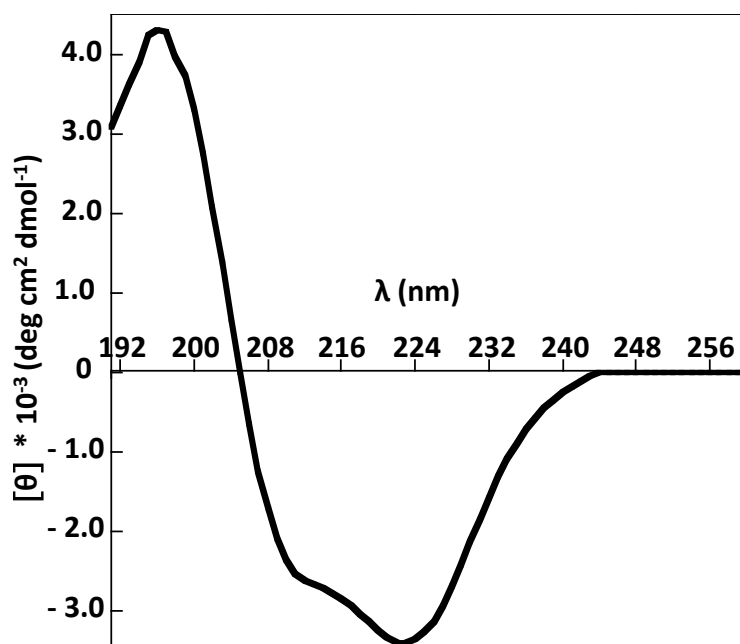


Figure III.3.3.1.1: Spectre de dichroïsme circulaire du peptide VP7₂₃ à 30 μ M solubilisé dans une solution d'eau contenant des micelles de DPC à 3 mM. Le spectre a été réalisé à pH 3.0 et à température ambiante.

III.3.3.2 Détermination de la structure 3D du peptide VP7₂₃ par RMN dans un mélange CD₃OH/CDCl₃ (1/1)

III.3.3.2.1 Détermination des contraintes RMN

La structure de VP7₂₃, le domaine minimum d'interaction avec les membranes a été déterminée par RMN en combinaison avec des calculs de dynamique moléculaire dans un mélange CD₃OH/CDCl₃ (1/1). L'acquisition des spectres RMN 2D ¹H-¹H NOESY, TOCSY et DQF-COSY a été réalisée pour une concentration en peptide égale à 1 mM à 293K et à différents temps de mélange (NOESY : 200 ms, 150 ms et 100 ms). L'attribution complète des protons a été effectuée en deux étapes en combinant les informations obtenues par analyse des spectres TOCSY et NOESY. La première étape a consisté à identifier l'ensemble des systèmes de spins (voir table des déplacements chimiques, Chapitre V: Annexe paragraphe V.1) grâce aux corrélations à travers les liaisons entre tous les protons d'un même résidu, obtenus par analyse des spectres TOCSY et DQF-COSY. Une fois que la 1^{ère} étape a été achevée, chaque système de spins a été identifié dans la séquence grâce aux corrélations

dipolaires, obtenues par analyse des spectres NOESY, entre deux protons appartenant à des résidus consécutifs dans la séquence (Figure III.3.3.2.1.1 et Figure III.3.3.2.1.2).

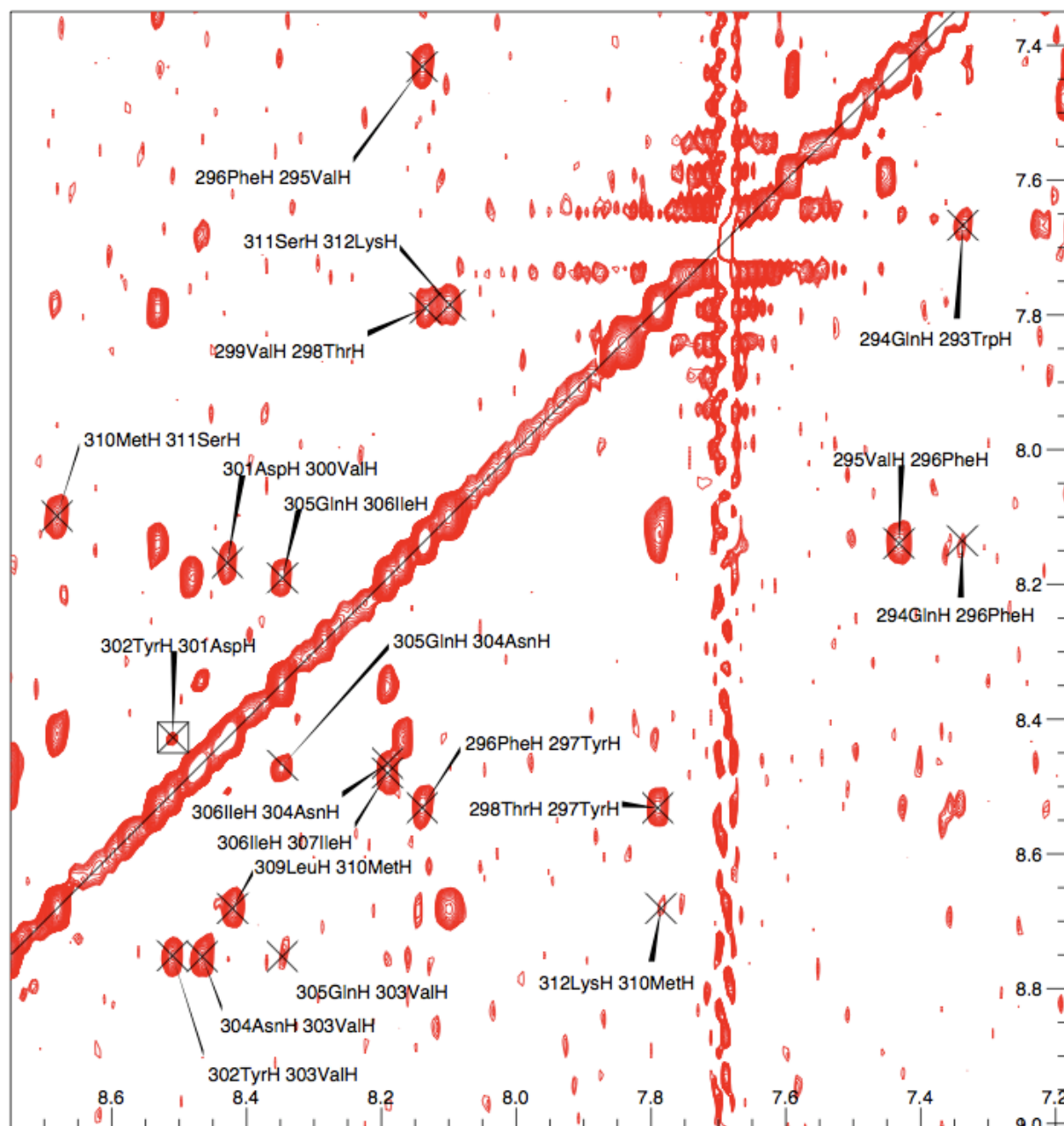


Figure III.3.3.2.1.1 : Région NH/NH du spectre NOESY réalisé à $T = 293\text{K}$ pour un temps de mélange $T_m = 200\text{ ms}$, sur le domaine C-terminal VP7₂₃ (1 mM) dérivé de la maturation par la trypsine de la glycoprotéine VP7. Cette région met également en évidence des corrélations de moyenne portée de type NH/NH ($i, i+2$).

La déviation des déplacements chimiques (CSD) a été déterminée pour les protons $H\alpha$, et les valeurs sont représentées dans la Figure III.3.3.2.1.3. Ces valeurs (CSD) correspondent à la différence de déplacement chimique pour les protons α observés expérimentalement sur notre spectre et ceux de peptides de conformation aléatoire (random coil)²⁹⁷. Cette étude donne des indications sur la structure secondaire locale du squelette peptidique pour chaque résidu, les valeurs négatives du CSD (inférieures à -0.1 ppm) révèlent une grande prédisposition du peptide VP7₂₃ à adopter une structure hélicoïdale à l'exception des trois derniers résidus.

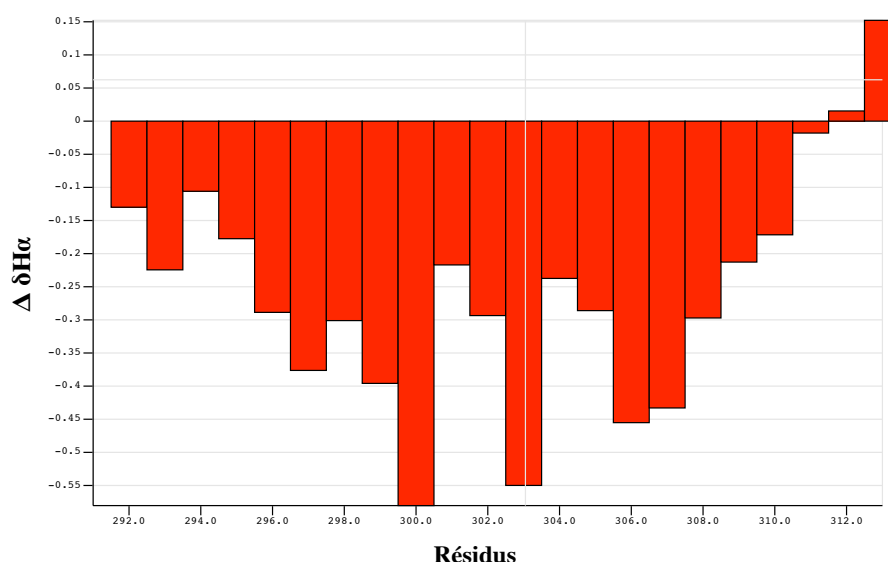


Figure III.3.3.2.1.3 : Variation des déplacements chimiques (CSD) des protons $H\alpha$ du peptide VP7₂₃, en présence d'un mélange $CD_3OH/CDCl_3$ (1/1) par rapport à une structure random coil. Le peptide VP7₂₃ est dérivé de la maturation par la trypsine de la glycoprotéine VP7.

Les expériences NOESY nous ont permis non seulement d'identifier les corrélations dipolaires séquentielles, mais également d'attribuer un grand nombre de NOEs de moyenne portée de type $\alpha N(i, i+2)$, $NN(i, i+2)$, $\alpha N(i, i+3)$, $\alpha\beta(i, i+3)$ ou $\alpha N(i, i+4)$, dans le mélange $CD_3OH/CDCl_3$ (1/1). L'intégralité des NOEs observés est reportée dans la Figure III.3.3.2.1.4. Seuls les deux acides aminés N-terminaux, K291, et W292 ont posé quelques problèmes lors de l'analyse. L'identification de la K291 a été possible par analyse du spectre

TOCSY, alors que l'identification du W292 a été confirmée par la présence d'un NOE de moyenne portée de type $\alpha\beta(i, i+3)$.

L'analyse des contraintes de distances et les déplacements chimiques, indique la présence d'un grand nombre de corrélations intenses NH/NH ainsi que des corrélations de type $\alpha N(i, i+2)$, $NN(i, i+2)$, $\alpha N(i, i+3)$, $\alpha\beta(i, i+3)$ ou $\alpha N(i, i+4)$ mettant en évidence une forte structuration en hélice α du peptide VP7₂₃, qui s'étend du résidu W292 au résidu M310.

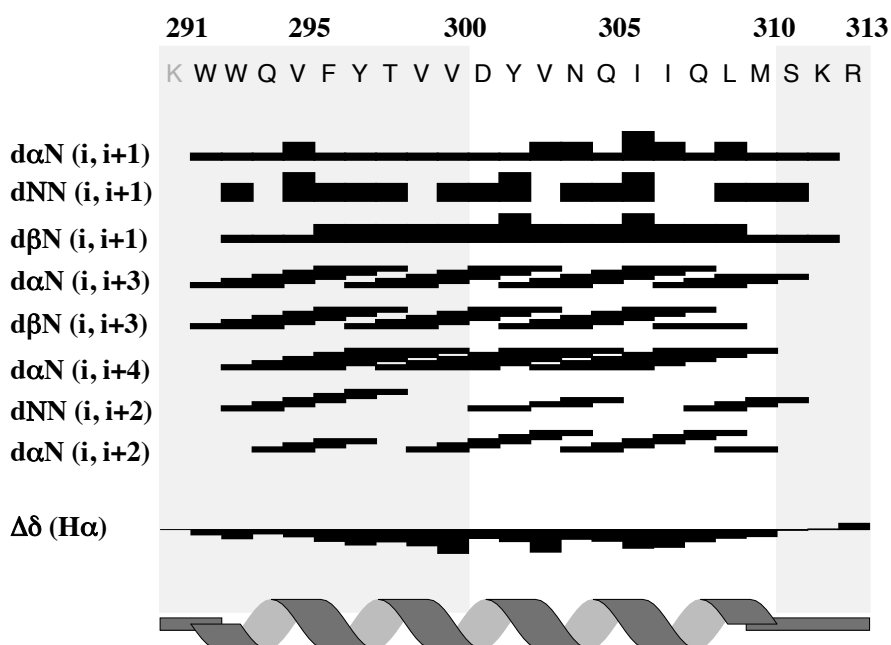


Figure III.3.3.2.1.4 : Représentations des connectivités NOEs séquentiels et de moyenne portée obtenues par analyse des spectres NOESY 2D ^1H - ^1H . L'épaisseur des traits est proportionnelle à l'intensité des NOEs. La discontinuité des traits observée pour les corrélations $dNN(i, i+1)$ correspond aux connectivités qui n'ont pas été observées en raison de déplacements chimiques très proches ou superposés.

III.3.3.2.2. Modélisation moléculaire sous contraintes RMN

Le calcul de la structure du peptide VP7₂₃ a été effectué de façon itérative par l'utilisation simultanée des logiciels, ARIA et CNS. Le nombre d'itérations réalisées par ARIA a été fixé à 8 et au cours de ces itérations les bornes des contraintes de violations ont été fixées à 0.2 Å et les contraintes toujours violées sont éliminées. La neuvième itération correspond à une étape d'analyse et d'affinement des structures. Ce processus a été renouvelé 4 fois jusqu'à l'introduction de toutes les données expérimentales qui doivent être en accord

avec les structures de plus basses énergies obtenues. ARIA utilise les données initiales du projet CcpNmr, qui contient une table de déplacements chimiques, une liste de pics NOEs attribués manuellement et les spectres RMN expérimentaux. Au cours du calcul de modélisation moléculaire 408 contraintes de distances ont été utilisées, ces dernières se décomposent en NOEs intra-résiduels, NOEs séquentiels et NOEs moyennes portées tel que décrit dans le tableau III.3.3.2.2.1. Les NOEs de structures secondaires (moyenne portée) observés pour chaque résidu sont représentés sur la Figure III.3.3.2.2.1

Type de NOEs	NOEs intra-résiduels	NOEs séquentiels	NOEs moyenne portée
Nombre de NOEs	239	79	90

Tableau III.3.3.2.2.1: Contraintes NOEs obtenues par analyse des expériences RMN 2D ^1H - ^1H NOE enregistrées sur le peptide VP7₂₃ dans le mélange CD₃OH/CDCl₃ (1/1).

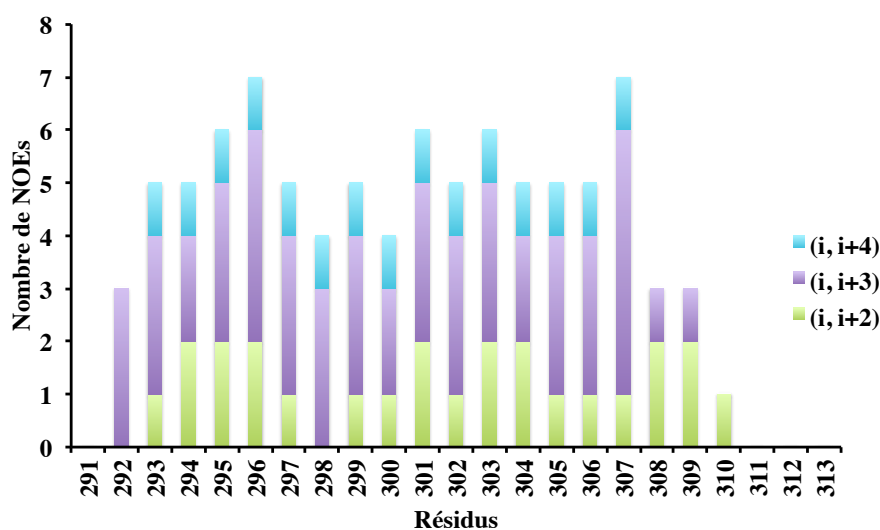


Figure III.3.3.2.2.1: Représentation du nombre de NOEs de structure secondaire obtenu pour chaque résidu du peptide VP7₂₃, par analyse des expériences RMN 2D ^1H - ^1H NOESY

Le logiciel ARIA/CNS a permis grâce à des techniques de recuit simulé (simulated annealing) de générer un jeu de 100 structures satisfaisant les données expérimentales issues de la l'analyse des spectres RMN. La qualité des structures obtenues a été évaluée en se

basant sur les paramètres décrits ci dessous et les 10 meilleures structures ont été retenues pour une analyse structurale

- Energie intramoléculaire totale la plus faible,
- Nombre de violations : Après affinement dans la boîte d'eau, seules les structures possédant un faible nombre de violations de contraintes de distances, inférieures à 0.2 Å, sont conservées.
- Cartes de Ramachandran: la distribution des couples (Φ , Ψ) ne doit pas s'écarter des zones stériques permises.
- La valeur de l'écart-type moyen sur les coordonnées atomiques (r.m.s.d) : la convergence entre les structures générées est mesurée par l'écart type entre les positions (x, y, z) des atomes du squelette peptidique de ces différentes structures et les structures présentant une bonne convergence sont retenues.

Les statistiques structurales obtenues pour les 10 meilleures structures présentant les énergies totales les plus faibles sont résumées dans le tableau III.3.3.2.2.2.

<i>Distance violations ($> 0.2 \text{ \AA}$)</i>	0
<i>r.m.s.d. from experimental distance restraints (\AA)</i>	$(1.440 - 1.968) 10^{-2}$
<i>r.m.s.d. from idealized geometry</i>	
bonds (\AA)	$(2.463 - 2.739) 10^{-3}$
angles (deg)	0.351 – 0.420
improper angles (deg)	0.912 – 1.204
<i>ARIA potential energys (Kcal/mol)</i>	
E _{NOE}	4.172 – 7.788
E _{VDW}	$(-54.225) - (-79.760)$
E _{BOND}	2.591 – 3.205
E _{ANGLES}	13.875 – 20.684
E _{IMPROPERS}	8.044 – 12.452
E _{TOTAL}	$(-797.74) - (-770.096)$
<i>Atomic r.m.s.d. on the backbone atoms (\AA)</i>	To mean structure
(W292 – M310)	0.446
<i>Ramachandran analysis of residues</i>	
favored region (%)	90.6 %
additional allowed regions (%)	7.15 %
generously allowed regions (%)	1.82 %
disallowed regions (%)	0.48 %

Tableau III.3.3.2.2.2: Analyse statistique des 10 meilleures structures présentant l'énergie totale la plus faible, obtenues par la méthode du recuit simulé, sous contraintes RMN par l'utilisation simultanée des logiciels ARIA et CNS.

III.3.3.2.2.1 Analyse des structures obtenues

Les 10 meilleures structures de plus basse énergie du peptide VP7₂₃ dans le mélange CD₃OH/CDCl₃ (1/1) ont été superposées (Figure III.3.3.2.2.1.1). L'analyse des structures indique que le domaine C-terminal VP7₂₃, présente une forte structuration (83 %) en hélice α qui s'étend des résidus W292 à M310 dans laquelle seulement 4 résidus ne sont pas impliqués dans la structure secondaire en hélice. Les structures calculées semblent être en accord avec l'analyse des NOEs de structures secondaires et avec les valeurs des CSD. Les structures convergent fortement avec un r.m.s.d de 0.466 Å sur les atomes du squelette (W292-M310).

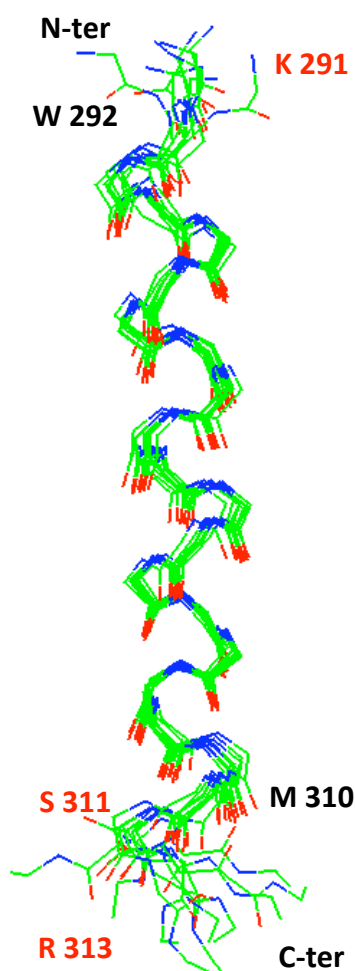


Figure III.3.3.2.2.1.1 : Superposition sur le motif hélice α des 10 meilleures structures du peptide VP7₂₃ obtenues par RMN dans un mélange équimolaire CD₃OH/CDCl₃. La région en hélice α s'étend du résidu W292 au résidu M310 alors que les régions flexibles sont représentées par les résidus indiqués en rouge.

III.3.3.2.2.2 Caractéristiques structurales de l'hélice α (W292-M210)

L'analyse des propriétés amphiphiles de la meilleure structure hélicoïdale du peptide VP7₂₃ obtenue en présence de CD3OH/CDCI3 (1/1) a été réalisée. Les résidus ont été classés en fonction du caractère hydrophobe (en rouge) ou hydrophile (en bleu) de leurs chaînes latérales. La Figure III.3.3.2.2.1, montre les propriétés amphipathiques de cette hélice caractérisée par une face hydrophile constituée par les résidus Q294, Y297, D301, N304 et Q308, alors que la face hydrophobe comporte les chaînes latérales des résidus W292, F296, V299, V303, I306 et M310.

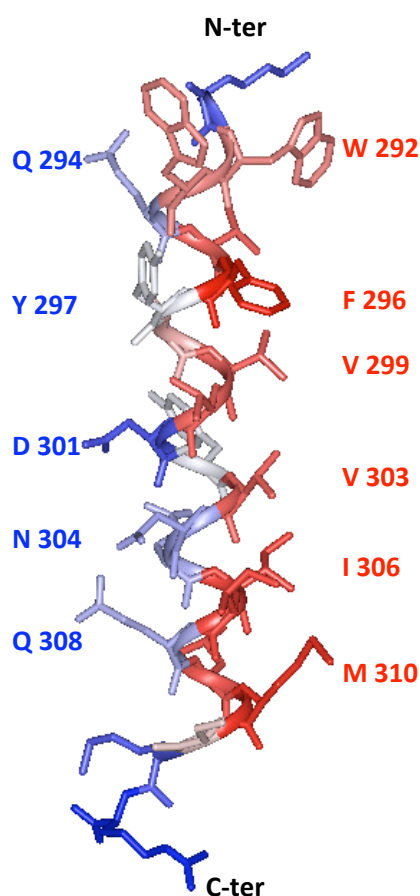


Figure III.3.3.2.2.1 : Représentation de la structure de plus faible énergie du domaine C-terminal VP7₂₃ de la glycoprotéine VP7, montrant le caractère amphipathique de l'hélice α qui s'étend entre les résidus W292 et M310. Les résidus sont distingués en fonction du caractère hydrophobe (rouge) ou hydrophile (bleu) des chaînes latérales, mettant en évidence les propriétés amphipathiques du peptide VP7₂₃.

III.3.3.3 Détermination de la structure 3D du peptide VP7₂₃ dans des micelles de DPC, par RMN.

III.3.3.3.1. Détermination des contraintes RMN

Pour réaliser les expériences de RMN 2D ^1H - ^1H (TOCSY, NOESY et DQF-COSY), les échantillons ont été préparés par la mise en solution de 19.5 mg de DPC- d_{38} (Cambridge Isotope Laboratories, Inc. Catalogue référence DLM-2274) dans un mélange 90% d'eau et 10% de D_2O . Une solution micellaire de DPC à 100 mM est ainsi obtenue. Ce tensioactif est caractérisé par une tête polaire large est un paramètre d'empilement $\rho < 0.33$, ce qu'il lui confère une capacité de s'organiser en micelles à des concentrations supérieures à la CMC (de l'ordre de 1.1 mM). Cette solution micellaire a été utilisée pour dissoudre 1.47 mg du peptide VP7₂₃. Après homogénéisation de l'échantillon, le pH a été ajusté afin d'obtenir une solution de peptide (à 1mM) à pH 3.0. L'analyse des spectres NOESY, TOCSY et DQF-COSY enregistrés à 323K nous a permis d'effectuer l'attribution complète des protons pour l'ensemble des systèmes de spins (voir table des déplacements chimiques, Annexe paragraphe I.2) grâce aux corrélations à travers les liaisons entre tous les protons d'un même résidu.. Par la suite chaque système de spin a été identifié dans la séquence grâce aux corrélations dipolaires (Figures III.3.3.3.1.1; III.3.3.3.1.2 et III.3.3.3.1.3), obtenues par analyse des spectres NOESY, entre deux protons appartenant à des résidus consécutifs dans la séquence.

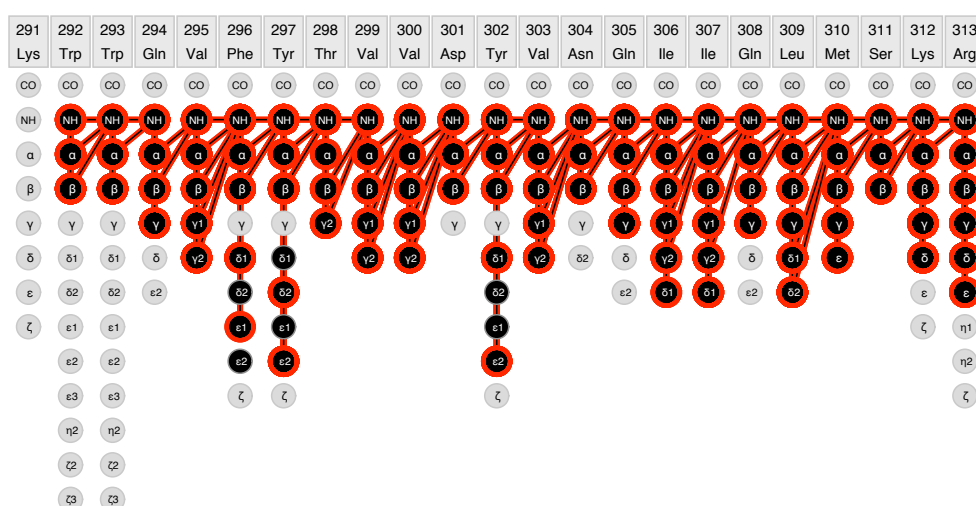


Figure III.3.3.3.1.1 : Schéma d'attribution séquentielle obtenu pour le peptide VP7₂₃ dans les micelles de DPC- d_{38} grâce au logiciel CcpNmr d'après la méthode de Wüthrich (1986).

La comparaison des spectres 2D ^1H - ^1H NOESY du peptide VP7₂₃ enregistrés en présence de DPC (Figure III.3.3.1.2 et Figure III.3.3.1.3) et du mélange CD₃OH/CDCl₃ (1/1) met en évidence une meilleure dispersion des déplacements chimiques en présence du mélange CD₃OH/CDCl₃ (1/1) contrairement au DPC, milieu dans lequel on observe une concentration des protons amides sur une faible plage de déplacements chimiques.

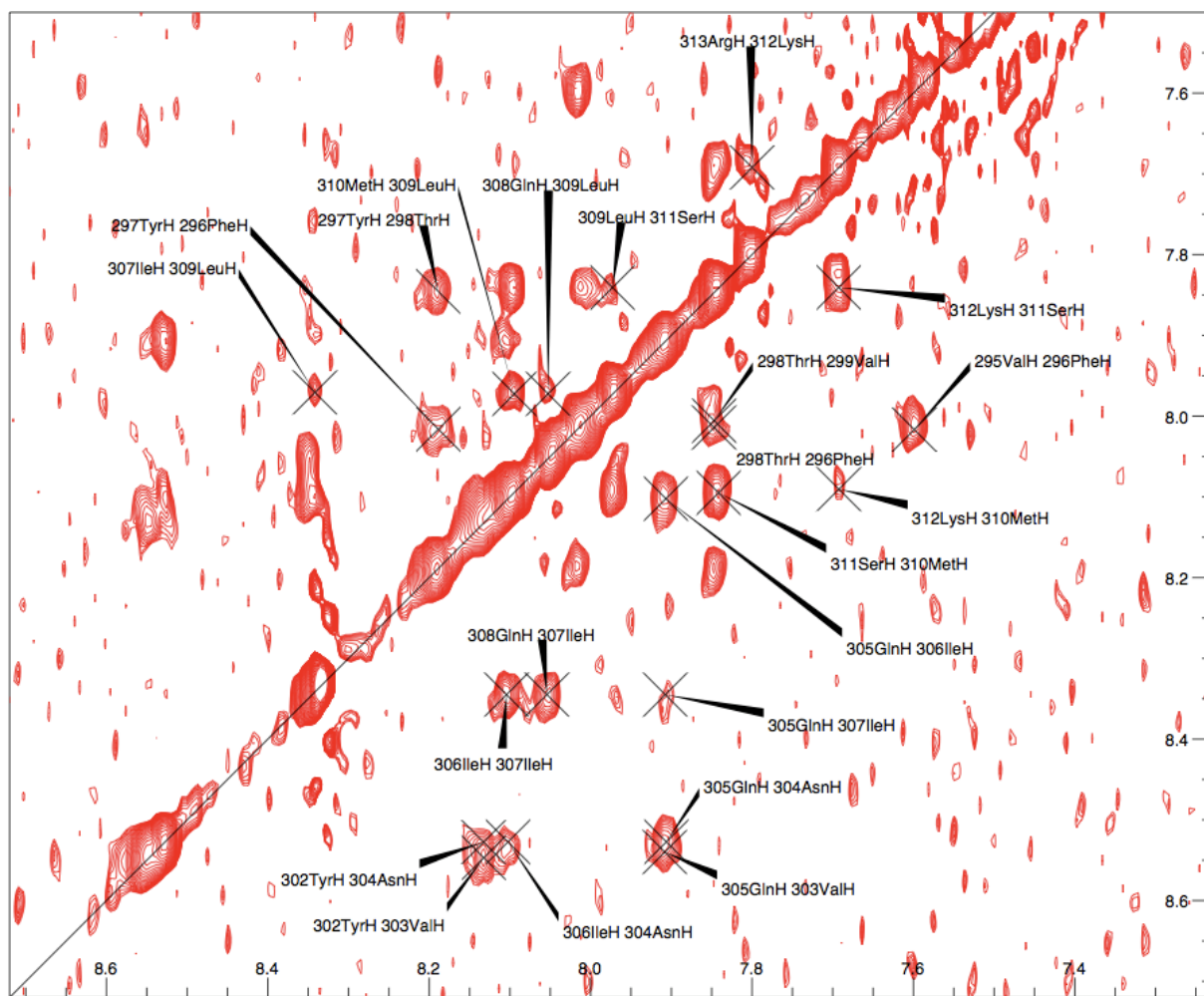


Figure III.3.3.1.2: Région NH/NH du spectre NOESY du peptide VP7₂₃ (1 mM) dérivé de la maturation par la trypsine du domaine C-terminal de la glycoprotéine VP7. L'expérience a été réalisée en présence de micelles de DPC-d₃₈ (100 mM) à $T = 323\text{K}$ et $\text{pH} = 3.0$, pour un temps de mélange $T_m = 250\text{ ms}$. Cette région met également en évidence des corrélations de moyenne portée de types NH/NH ($i, i+2$).

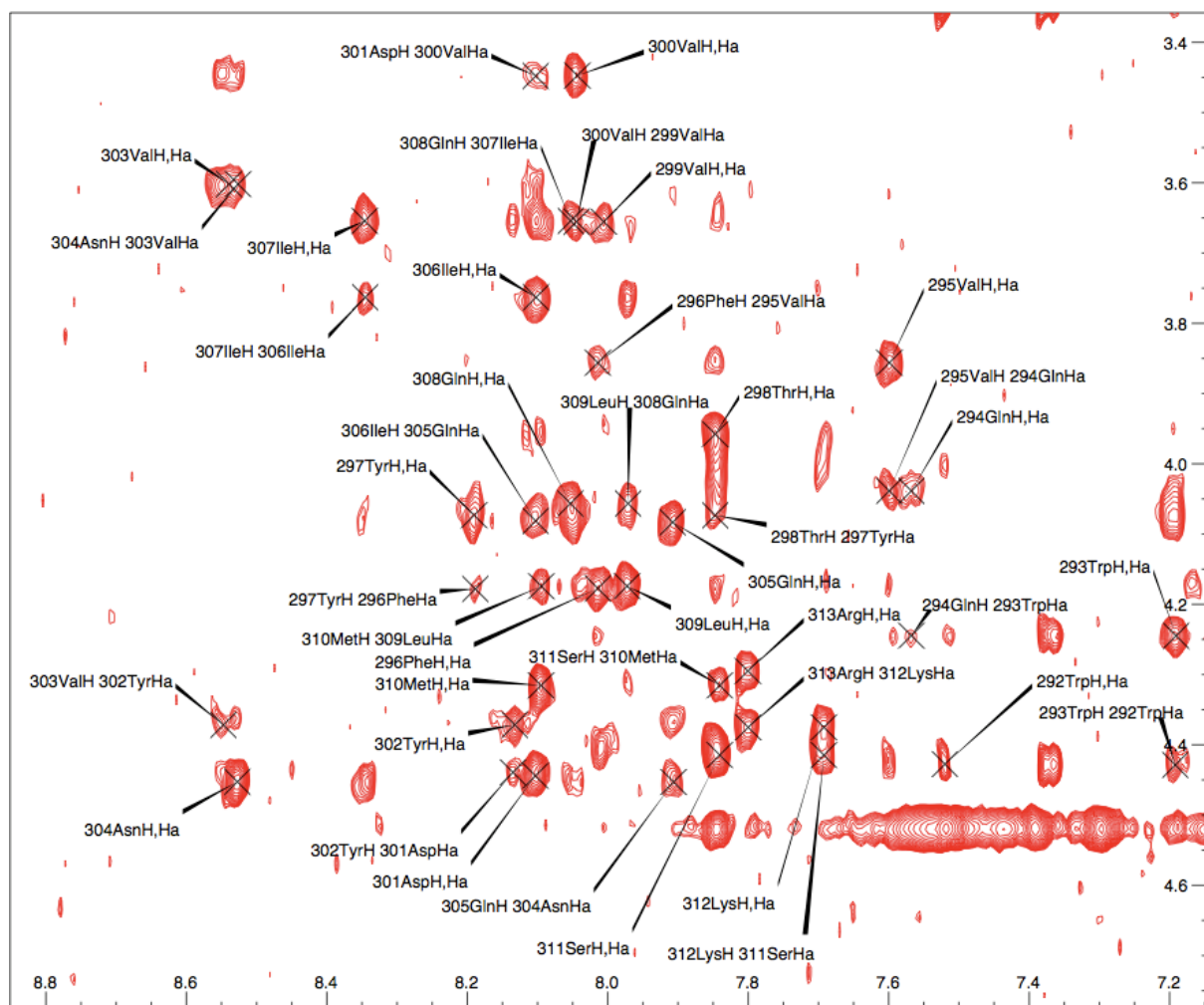


Figure III.3.3.3.1.3: Représentation de la région NH/NH du spectre NOESY réalisé dans des micelles de DPC-_{d38} (100 mM) sur le peptide VP7₂₃ (1 mM), dérivé de la maturation par la trypsine du domaine C-terminal de la glycoprotéine VP7.L'expérience a été réalisée à $T = 323\text{K}$ et $\text{pH} = 3.0$, pour un temps de mélange $T_m = 250\text{ ms}$. Cette région montre également les corrélations séquentielles de type NH/H α ($i, i-1$).

L'analyse de la déviation des déplacements chimiques (CSD) a été également faite telle que décrite précédemment, pour les protons $H\alpha$ dans le DPC-d₃₈ et les valeurs sont rapportées dans la Figure III.3.3.3.1.4. Cette étude nous donne des informations sur la structure secondaire locale du squelette peptidique pour chaque résidu. Les valeurs négatives du CSD obtenues (inférieures à -0.1 ppm), révèlent une grande propension du peptide VP7₂₃ à adopter une structure hélicoïdale, à l'exception des résidus Q294 et V295 et l'on distingue, d'après l'histogramme des CSD, une interruption de l'hélice α au niveau de ces résidus. D'après l'attribution des résonances et le calcul des CDS nous avons des valeurs correspondant à des protons déblindés, or dans le cas d'une hélice α les protons $H\alpha$,

impliqués dans les liaisons hydrogènes sont blindés comparé aux valeurs de références de Wishart, observés pour des structures désordonnées de séquence GGXAGG (X est l'acide aminé analysé). D'autre part nous pouvons également observer que les trois derniers résidus en C-terminal ne sont pas impliqués dans l'hélice.

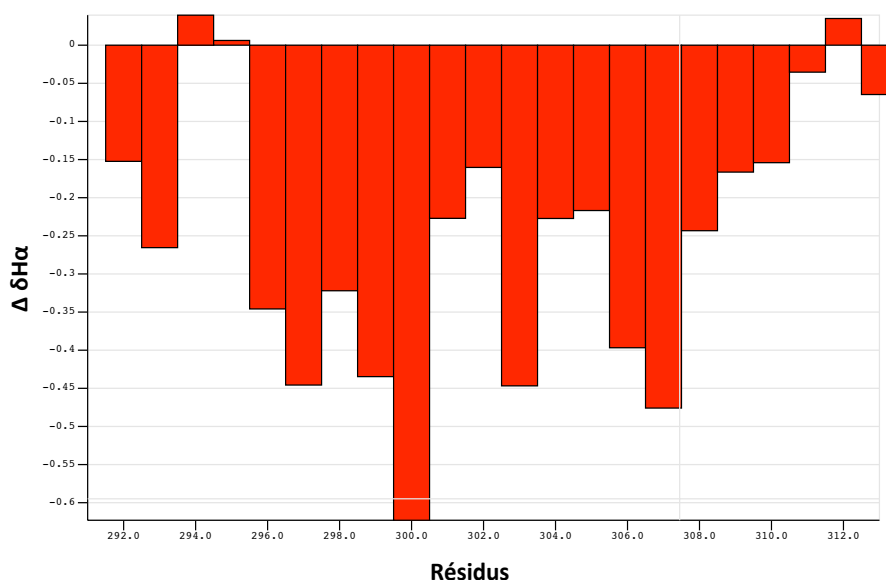


Figure III.3.3.1.4: Représentation de la déviation des déplacements chimiques (CSD) des protons H_{α} du peptide $VP7_{23}$, dérivé de la maturation par la trypsine de la glycoprotéine VP7, en présence de micelles de DPC_{d38} . Cette analyse est effectuée par rapport aux déplacements chimiques observés dans une structure désordonnée.

Les expériences NOESY ont été analysées afin d'identifier les corrélations dipolaires séquentielles (Figure III.3.3.1.2 et Figure III.3.3.1.3), les CSD (Figure III.3.3.1.4) et également pour attribuer les NOEs de moyenne portée de type $\alpha N(i, i+2)$, $NN(i, i+2)$, $\alpha N(i, i+3)$, $\alpha \beta(i, i+3)$ ou $\alpha N(i, i+4)$ en présence des micelles de DPC. L'ensemble des NOEs observés est indiqué dans la Figure III.3.3.1.5.

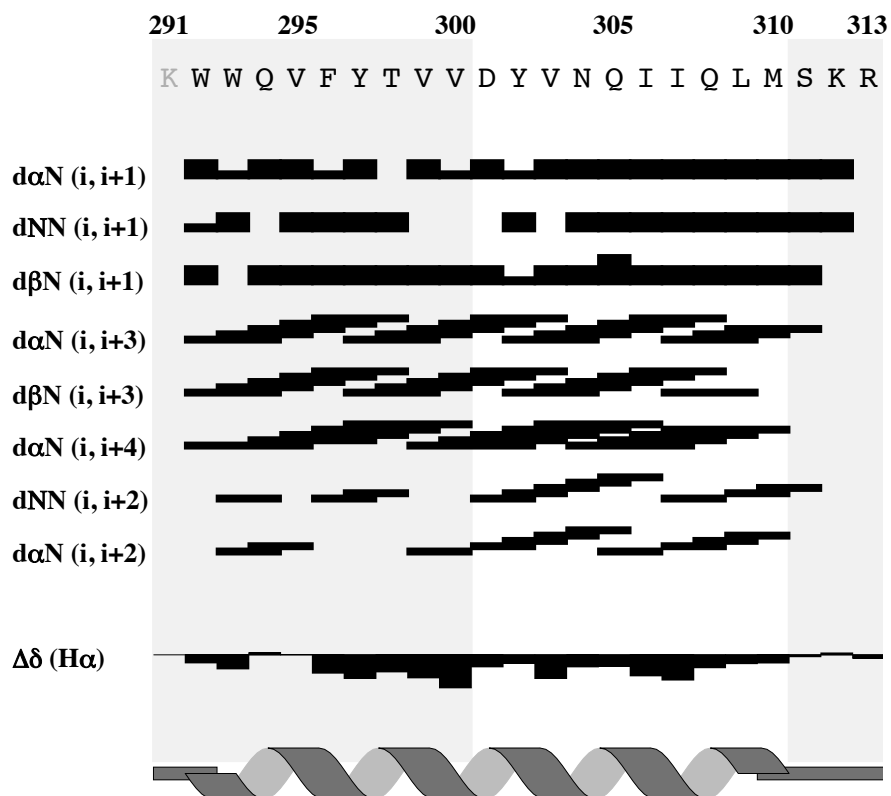


Figure III.3.3.1.5 : Représentation des connectivités NOEs séquentielles et moyenne portée obtenues par analyse des spectres 2D ^1H - ^1H NOESY. L'épaisseur des traits est proportionnelle à l'intensité des NOEs. La discontinuité des traits observée pour les corrélations $d\text{NN}(i, i+1)$ correspond aux connectivités qui n'ont pas été observées en raison des déplacements chimiques qui sont très proches ou dégénérés.

Les résultats obtenus (Figure III.3.3.1.5) indiquent la présence d'un grand nombre de corrélations intenses NH/NH et de corrélations de type $\alpha\text{N}(i, i+3)$, $\alpha\beta(i, i+3)$ ou $\alpha\text{N}(i, i+4)$ mettant en évidence une forte structuration du peptide VP7₂₃ dans le DPC en hélice α , s'étendant du résidu W292 au résidu M310. Les résultats obtenus par mesure des CSD sont en accord avec l'analyse des NOEs de structures secondaires, à l'exception des résidus Q294 et V295 pour lesquels l'histogramme des CSD montre une interruption de l'hélice α , alors que les NOEs de types $\text{H}\alpha/\text{H}\beta(i, i+3)$ entre les résidus Q294, Y297 et les résidus V295, T298 respectivement ont été observés.

III.3.3.3.2. Modélisation moléculaire sous contraintes RMN

Le calcul des structures tertiaires du peptide VP7₂₃ en présence des micelles de DPC-d₃₈ a été effectué tel que décrit précédemment pour la structure obtenue dans le mélange CD₃OH/CDCl₃ (1/1), voire le paragraphe I.3.2.2, de façon itérative.

Au cours du calcul de modélisation moléculaire 368 contraintes de distances ont été utilisées, se décomposent en NOEs intra-résiduels, NOEs séquentiels et NOEs moyenne portée reportés dans le tableau III.3.3.3.2.1. Les NOEs de moyenne portée observés pour chaque résidu sont résumés dans la Figure III.3.3.3.2.1.

Type de NOEs	NOEs intra-résiduels	NOEs séquentiels	NOEs moyenne portée
Nombre de NOEs	205	74	89

Tableau III.3.3.3.2.1 : Contraintes NOEs obtenues par analyse des expériences RMN 2D 1H-1H NOESY et TOCSY.

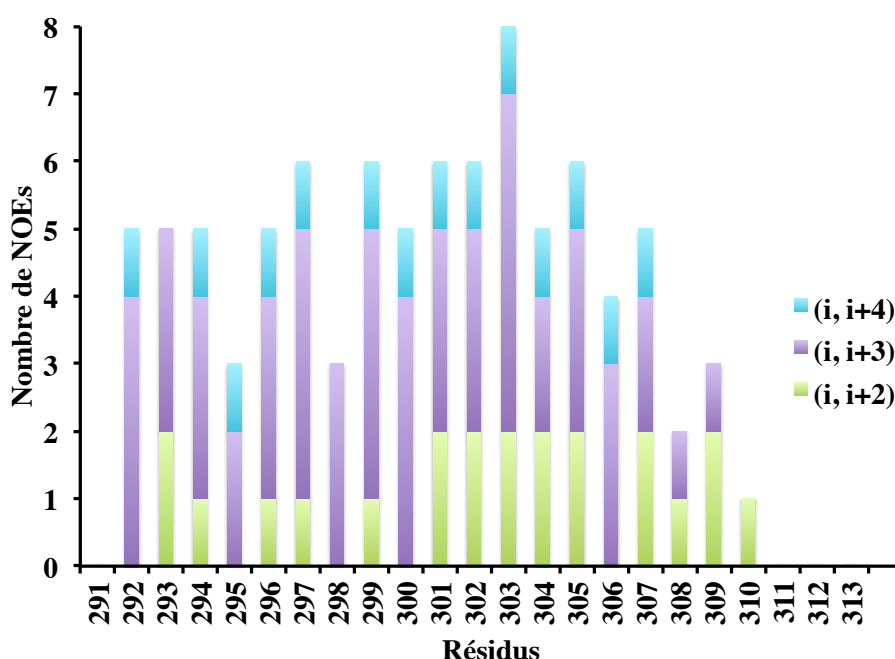


Figure III.3.3.3.2.1 : Représentation du nombre de NOEs de structure secondaire obtenu par analyse des expériences RMN 2D ¹H-¹H NOESY pour chaque résidu du peptide VP7₂₃.

Par la méthode du recuit simulé, la modélisation moléculaire du peptide à partir des contraintes RMN a été réalisée avec le logiciel ARIA/CNS qui a permis de générer un jeu de 100 structures satisfaisant les données expérimentales issues de l'analyse des spectres RMN. La qualité des structures obtenues a été évaluée en se basant sur les paramètres déjà décrits précédemment : énergie intramoléculaire totale la plus faible, faible nombre de violations de contraintes de distances $< 0.2 \text{ \AA}$, bonne distribution des couples (Φ , Ψ) sur les cartes de Ramachandran et la bonne convergence du jeu de structures respectant les contraintes NOE. Les 10 meilleures structures ont été retenues pour une analyse statistique résumée dans le tableau III.3.3.2.2.

Analyse des structures obtenues

<i>Distance violations ($> 0.2 \text{ \AA}$)</i>	0
<i>r.m.s.d. from experimental distance restraints (\AA)</i>	$(1.259 - 2.272) 10^{-2}$
<i>r.m.s.d. from idealized geometry</i>	
bonds (\AA)	$(2.408 - 3.137) 10^{-3}$
angles (deg)	0.358 – 0.470
improper angles (deg)	0.881 – 1.239
<i>ARIA potential energys (Kcal/mol)</i>	
E_{NOE}	2.935 – 9.553
E_{VDW}	$(-52.193) - (-77.172)$
E_{BOND}	2.477 – 4.202
E_{ANGLES}	14.978 – 25.843
E_{IMPROPER}	7.704 – 13.702
E_{TOTAL}	$(-798.167) - (-777.279)$
<i>Atomic r.m.s.d. on the backbone atoms (\AA)</i>	<i>To mean structure</i>
(W292 – M310)	0.243
<i>Ramachandran analysis of residues</i>	
favored region (%)	93.2 %
additional allowed regions (%)	4.96 %
generously allowed regions (%)	1.48 %
disallowed regions (%)	0.38 %

Tableau III.3.3.2.2 : Analyse statistique des 10 meilleures structures du peptide VP7₂₃ présentant l'énergie totale la plus faible dans les micelles de DPC_{-d38}. Les structures ont été obtenues par la méthode du recuit simulé, sous contrainte RMN en utilisant simultanément le logiciel ARIA et CNS.

Les 10 meilleures structures de plus basse énergie du peptide VP7₂₃ dans les micelles de DPC-d₃₈ ont été regroupées et superposées (Figure III.3.3.2.2).

L'analyse des structures indique qu'en milieu micellaire, DPC, le domaine C-terminal VP7₂₃, issu de la maturation par la trypsine de la glycoprotéine VP7 présente une forte structuration (83 %) en hélice α s'étendant des résidus W292 à M310, et seulement 4 résidus sont très flexibles et n'adoptent pas de structure bien définie..

Les structures convergent fortement avec un r.m.s.d de 0.243 calculé sur les atomes du squelette de l'hélice sur les résidus W292-M310. Les structures 3D du peptide VP7₂₃ déterminées en présence des micelles de DPC-d₃₈ sont identiques à celles obtenues en présence du mélange CD₃OH/CDCl₃ (1/1). La comparaison des r.m.s.d indique une meilleure convergence des structures obtenues dans le DPC, bien que la partie N-terminal semble être mieux définie dans le CD₃OH/CDCl₃ (1/1).

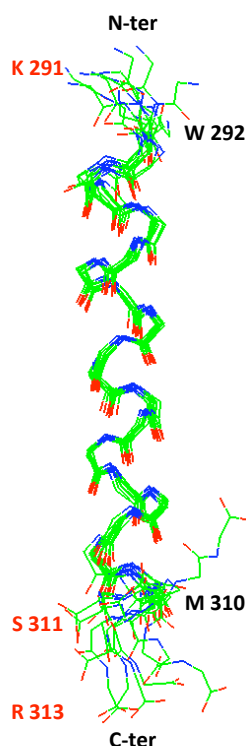


Figure III.3.3.2.2 : Superposition sur le motif hélice α des 10 meilleures structures du peptide VP7₂₃ obtenues par RMN en présence des micelles de DPC-d₃₈ à pH 3. La région en hélice α est représentée du N-ter vers le C-ter entre les résidus W292 et M310, et les régions flexibles sont représentées par les résidus indiqués en rouge.

III.3.3.3.3. Caractéristiques structurales de l'hélice α (W292-M210)

L'analyse des propriétés amphiphiles de la meilleure structure hélicoïdale du peptide VP7₂₃ obtenue en présence de micelles de DPC-d₃₈ a été réalisée. Les résidus ont été représentés en fonction du caractère hydrophobe (en rouge) ou hydrophile (en bleu) de leur chaîne latérale. La Figure III.3.3.3.1, montre que ce peptide possède les propriétés d'une hélice amphipathique caractérisée par une face hydrophile constituée par les résidus Q294, Y297, D301, N304 et Q308, et par une face hydrophobe comportant les résidus W292, F296, V300, V303, I306 et M310.

Les hélices α amphiphiles sont un motif très abondant dans les peptides perforateurs de membranes^{199,262,298-301}. Cette structure caractérisée par deux faces hydrophobe et hydrophile de part et d'autre de l'axe de l'hélice, permet une interaction optimale avec les molécules lipidiques amphiphiles, constituant les membranes biologiques. L'interaction initiale du peptide VP7₂₃ avec les têtes polaires des lipides est probablement suivie d'une réorientation du peptide, permettant à la face hydrophobe de ce dernier d'interagir avec les chaînes lipidiques aliphatiques, comme cela a été décrit dans la littérature pour d'autres peptides perforateurs de membranes³⁰². D'autre part ces résultats nous permettent d'expliquer les phénomènes d'agrégation du peptide dans l'eau. En effet en présence de solvant polaire des interactions hydrophobes peuvent se former entre les chaînes latérales des résidus hydrophobes formant ainsi des agrégats, tandis que les solvants hydrophobes permettent de diminuer ces interactions en formant des liaisons hydrophobes avec les chaînes latérales des résidus hydrophobes.

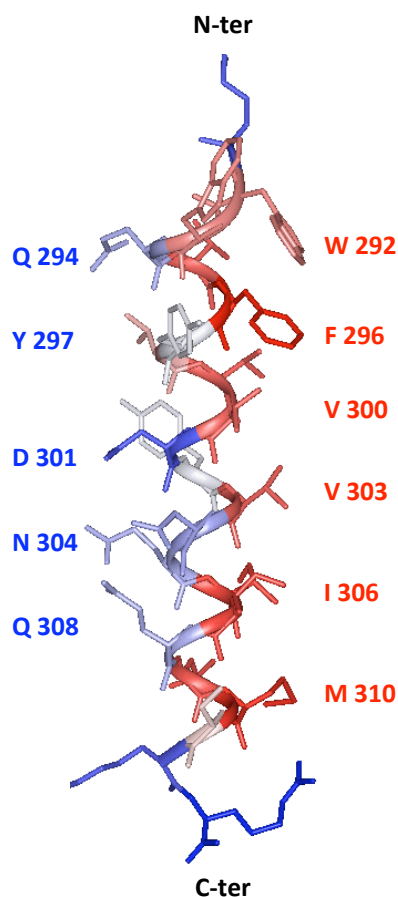


Figure III.3.3.3.1: Représentation de la structure de plus faible énergie du domaine C-terminal VP7₂₃ de la glycoprotéine VP7 obtenue en présence de DPC. On peut observer le caractère amphipathique de l'hélice α qui s'étend du résidu W292 au résidu M310. Ces résidus sont distingués en fonction du caractère hydrophobe (rouge) ou hydrophile (bleu) des chaînes latérales, mettant en évidence les propriétés amphipathiques du peptide VP7₂₃.

III.3.4. Comparaison de la structure du domaine VP7₂₃ déterminée par RMN et de son équivalent dans la structure cristallographique

L'objectif de cette étude était de déterminer la structure 3D du fragment tryptique issu de la glycoprotéine VP7, le plus actif sur les membranes. Notre but était de vérifier si cette structure peut rendre compte des propriétés biologiques de la protéine, impliquée dans la perméabilisation des membranes après maturation par la trypsine et dont le rôle a été mis en évidence par d'autres groupes^{128,132,152}.

La structure obtenue se caractérise par une hélice α amphipathique, très souvent présente dans les peptides perforateurs des membranes, exhibant deux faces distinctes hydrophobe et hydrophile, permettant une interaction optimale avec les molécules lipidiques

amphiphiles constituant les membranes biologiques. D'autre part, il est intéressant de remarquer que la maturation par la trypsine du domaine C-terminal de la glycoprotéine VP7, dont la structure a été déterminée par cristallographie par Aoki et al³³, entraîne un changement conformationnel du peptide VP7₂₃ (Figure I.3.4.1). En effet la comparaison de la structure du peptide VP7₂₃ obtenue par RMN avec le domaine correspondant dans la protéine native (Figure I.3.4.1), met en évidence un changement de la structure de cette hélice qui est coudée entre les résidus D301 et V303, résidus hautement conservés, dans la protéine native alors qu'elle est droite dans la structure que nous avons déterminée.

La maturation par la trypsine de la glycoprotéine VP7 au niveau de la K290, pourrait entraîner la perte des interactions hydrophobes entre les chaînes latérales des résidus M285 et I306 responsables de la courbure de l'hélice dans la protéine native. Il en résulte ainsi un redressement de l'hélice fortement courbée et la mise en place des deux faces hydrophobe et hydrophile responsables de l'activité perméabilisatrice de ce peptide au niveau des membranes. Cette modification semble nécessaire à l'activité perforatrice du peptide VP7₂₃ et l'on peut imaginer que la conservation de la courbure de l'hélice nuirait à l'activité comme nous le montrerons par la suite sur un peptide mutant de VP7₂₃.

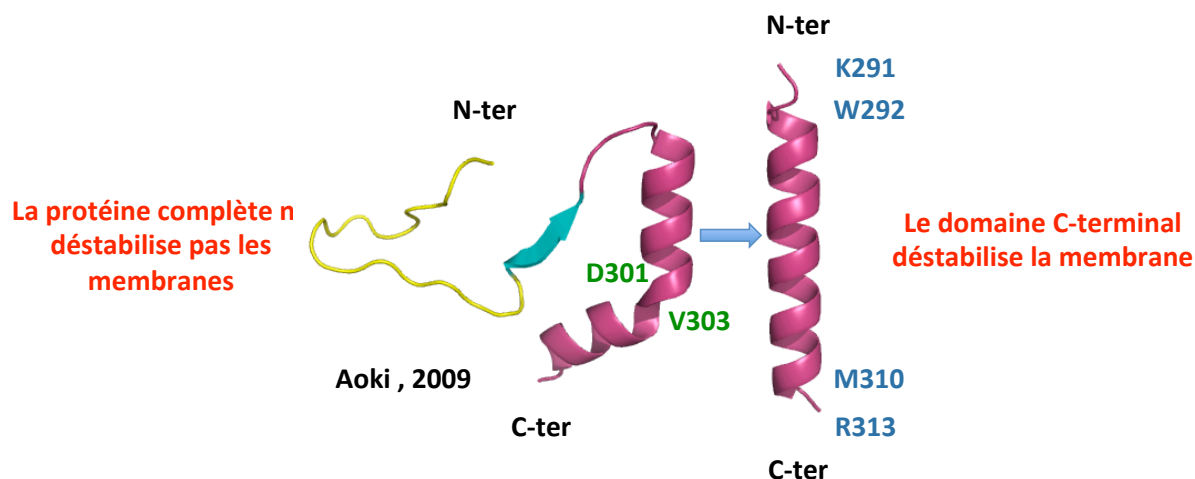


Figure I.3.4.1 : Le clivage par la trypsine entraîne le réarrangement du domaine C-ter de VP7. À droite en rose la structure RMN du peptide VP7₂₃ dans les micelles de DPC, et à gauche en rose le domaine équivalent dans la protéine native déterminé par Rayon-X par Aoki et al., 2009.

III.4 Effet des mutations du peptide VP7₂₃ sur sa capacité à déstabiliser les membranes

III.4.1. Objectif

Suite aux résultats obtenus précédemment, nous nous sommes intéressés à l'effet de la courbure observée dans la protéine native dans le fragment correspondant au peptide VP7₂₃ et à son effet sur l'activité biologique de VP7₂₃. En effet, la protéine VP7 native sous forme trimérique en présence de calcium ou sous forme monomérique après relargage du calcium mais en absence de trypsine, est incapable de perméabiliser les membranes. Nous voulons montrer que le redressement de l'hélice α après maturation par la trypsine de la glycoprotéine VP7, est nécessaire à son activité et nous avons donc procédé à une substitution des résidus impliqués dans la formation du coude. Ces résidus sont hautement conservés parmi les séquences de la glycoprotéine VP7 des différents groupes de rotavirus. Les résidus Y302 ou D301 ont donc été substitués successivement par une proline et deux nouveaux peptides ont donc été obtenus, VP7₂₃D301P et VP7₂₃Y302P. Nous savons que les prolines sont souvent responsables de courbures et d'interruptions au sein des hélices³⁰³⁻³⁰⁶ et leur chaîne latérale induisent une restriction de la conformation des protéines et des peptides.

Contrairement aux autres acides aminés, la proline présente une probabilité d'isomérisation cis-trans élevée³⁰⁷. Les travaux entrepris par plusieurs groupes ont permis de mettre en évidence l'importance de la nature du résidu X précédant la proline sur le taux d'isomérisation cis-trans. Les résultats indiquent que la présence des résidus dont les chaînes latérales sont volumineuses en aval d'une proline, favorisent la conformation cis de la proline.

Pour affirmer ou infirmer cette hypothèse, une étude de prédiction des éléments de structures secondaires utilisant le serveur PSIPRED a été entreprise à partir des séquences des peptides mutés VP7₂₃D301P et VP7₂₃Y302P, puis nous avons procédé à la synthèse du peptide VP7₂₃Y302P, tandis que le peptide VP7₂₃D301P a été commandé chez Proteogenix. Des tests de perméabilisation des vésicules contenant une sonde fluorescente extrinsèque ont été effectués et les éléments de structures secondaires qu'adoptent les mutants en présence de micelle de DPC-d38 ont été déterminés par dichroïsme circulaire tandis que l'étude par RMN est en cours.

III.4.2. Prédiction des structures secondaires

Une étude préliminaire des structures secondaires potentielles des mutants du peptide VP7₂₃, VP7₂₃D301P et VP7₂₃Y302P a été entreprise en utilisant le serveur de prédiction de structures secondaires PSIPRED. Les résultats obtenus révèlent une interruption de l'hélice α lorsqu'on substitue le résidu Y302 par une proline, confirmé également par RMN, (Figure III.4.2.1 A) alors que cette interruption de l'hélice n'est pas observée avec le mutant VP7₂₃D301P. D'après les études de prédiction de structures secondaires, ce mutant adopte une structure en hélice α qui s'étend du résidu F296 à K312, malgré la présence de la proline (Figure III.4.2.1 B). Les résultats obtenus avec le mutant VP7₂₃D301P, semblent être en désaccord avec les travaux entrepris par différents groupes³⁰⁸⁻³¹¹ montrant que les acides aminés possédant une chaîne latérale volumineuse situés en aval de la proline, favorisent une conformation cis de la proline. Dans ce cas le résidu proline (P301) est précédé par une valine (V300).

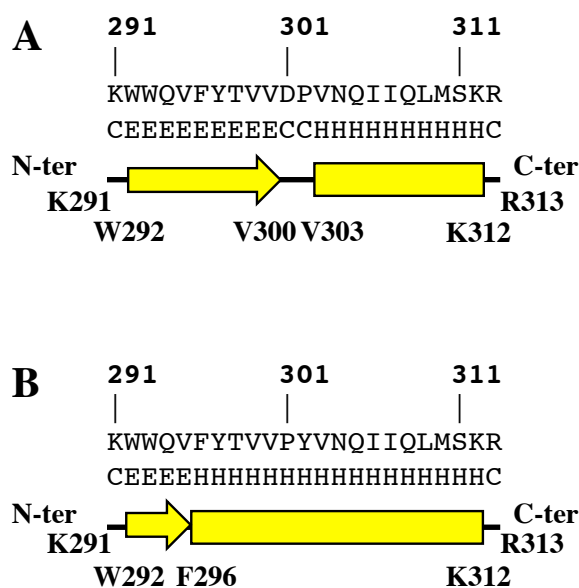


Figure III.4.2.1: Séquences primaires et prédictions des structures secondaires des deux peptides mutants VP₇₃D301P et VP₇₃Y302P du domaine minimum d'interaction avec les membranes, VP₇₃.

Prédiction des structures secondaires des mutants VP7₂₃Y302P (A) et VP7₂₃D301P (B) utilisant le logiciel PSIPRED. Les résidus sont indiqués d'après leur position dans la séquence de la glycoprotéine VP7.

C. random coil.

E. structure étendue.

H. hélice α

III.4.3. Interaction des peptides mutants avec les membranes modèles des vésicules larges unilamellaires d'Egg PC

Afin de déterminer l'effet des mutations sur la capacité des peptides à interagir avec les membranes modèles, 1 μ M de chaque peptide a été ajouté à une suspension de LUVs composée d'Egg PC à 40 μ M renfermant la 6-CF (60 mM). Un spectre témoin du peptide sauvage a été également enregistré dans les mêmes conditions.

Les vésicules larges unilamellaires d'Egg PC ont été préparées, comme cela a déjà été expliqué et décrit précédemment dans le paragraphe II.7 (Chapitre III: Matériels et Méthode.

La Figure III.4.3.1, représente les cinétiques de libération de la 6-CF induite par addition de chaque peptide. En effet, la libération de la 6-CF s'accompagne d'une augmentation de la fluorescence du milieu, liée à la déstabilisation des membranes modèles qui est induite par le peptide VP7₂₃. Ce dernier perd son activité biologique lorsqu'on substitue le résidu Y302 par une proline. La substitution du résidu Y302 par une proline semble supprimer toute activité déstabilisatrice du peptide (Figure III.4.3.1. A), tandis que la substitution du résidu D301 par une proline affecte l'efficacité du peptide à perméabiliser les membranes (Figure III.4.3.1. B).

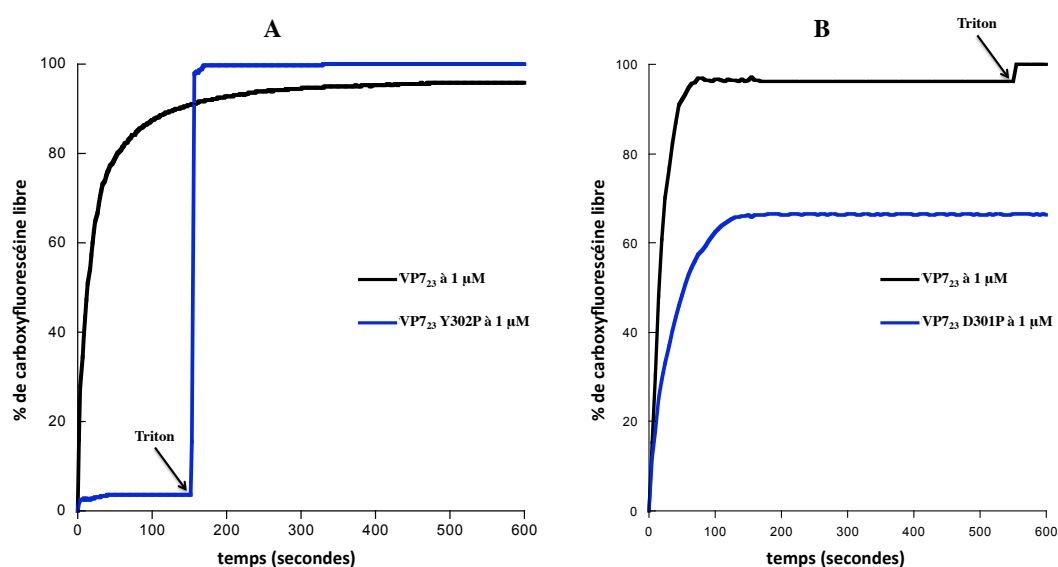


Figure III.4.3.1: Cinétique de la libération de la 6-CF dans le milieu réactionnel entraînée par l'addition du peptide VP7₂₃ (courbe noire, A et B), du peptide mutant VP7₂₃Y302P (courbe bleue, A) ou du peptide mutant VP7₂₃D301P (courbe bleue, B). Dans chaque expérience le peptide est à une concentration de 1 μ M. Les peptides sont ajoutés dans les suspensions des vésicules larges unilamellaires d'Egg PC dans un tampon phosphate (PBS 1 X et à pH = 7.4) au temps $t = 0$ et à 37°C. La concentration finale en lipides est de 40 μ M. Le 100% de lyse a été déterminé par addition de 10 μ L de 10% Triton X-100 dans le milieu réactionnel.

III.4.4. Etude de la structuration du peptide mutant VP7₂₃Y302P par dichroïsme circulaire

Une étude préliminaire permettant d'analyser la structuration des peptides sauvages VP7₂₃ et mutant VP7₂₃Y302P dans les micelles de DPC a été entreprise par dichroïsme circulaire. Les micelles ont été préparées par solubilisation de 19.5 mg de DPC-d₃₈ dans 500 μ L H₂O/D₂O (90% : 10%), ainsi on obtient une solution à 100 mM. Cette solution est utilisée pour dissoudre quelque mg de peptides et obtenir une concentration finale de 1 mM).

Après homogénéisation, le pH est ajusté à pH 3.0 et 9 μ L de cette solution ont été utilisés et complétés à 300 μ L par addition d'eau afin d'obtenir une solution finale de micelles à 3 mM en présence de 30 μ M de peptide. Cette solution a été utilisée pour l'enregistrement des spectres de dichroïsme circulaire et le reste de la solution pour l'étude structurale par RMN.

Comme montré précédemment, le peptide VP7₂₃ adopte une conformation en hélice α dans ces conditions d'étude (DPC), pour un rapport peptide/lipide égale à 1/100. D'après les résultats obtenus (Figure III.4.4.1. A), cette structure en hélice α est caractérisée par la présence des deux minima (210 nm et 223 nm) et deux maxima (196 nm et 216 nm). Par ailleurs, il semblerait que le peptide mutant VP7₂₃Y302P (Figure III.4.4.1. B), adopte une conformation différente de celle observée pour le peptide sauvage, avec un rapport peptide/lipide de 1/100.

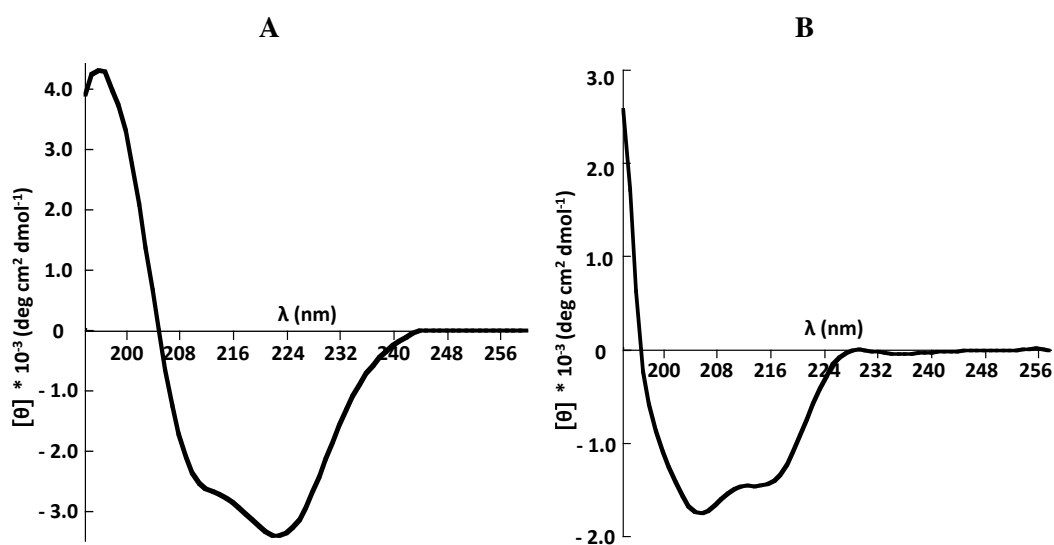


Figure III.4.4.1: Spectre de dichroïsme circulaire A. du peptide VP7₂₃ ou B. du peptide VP7₂₃Y302P à 30 μ M solubilisé dans une solution d'eau contenant des micelles de DPC à 3 mM. Le spectre a été réalisé à pH 3.0 et à température ambiante.

Ces résultats révèlent une modification de la structure du peptide mutant par rapport au peptide sauvage qui expliquerait la perte d'activité observée. De plus, la superposition des spectres RMN obtenus dans les mêmes conditions, respectivement pour VP7₂₃wt et VP7₂₃Y302P, indiquent une différence de la dispersion des pics NOEs.

III.4.5. Détermination de la constante d'affinité du peptide VP7₂₃Y302P pour les bicouches d'Egg PC par PWR

La constante d'affinité du peptide VP7₂₃Y302P pour les bicouches d'Egg PC a été obtenue par l'analyse des courbes de saturation hyperbolique, qui représente la variation d'angle de résonance de la polarisation p ou s en fonction de la concentration en peptide injectée. Les détails concernant cette technique ont déjà été donnés précédemment. Des concentrations croissantes de peptide variant de 100 pM à 200 nM ont été ajoutées dans la cellule de PWR, contenant la bicouche lipidique.

Les constantes de dissociation déterminées sont des constantes apparentes K_d car lors de l'interaction du peptide avec la membrane d'autres phénomènes tels que la réorganisation membranaire et la solvation, se produisent simultanément.

Les valeurs des constantes de dissociation déterminées pour chaque peptide sont indiquées dans le tableau III.4.5.1. Elles montrent clairement que la substitution Y302P induit une diminution de l'affinité du peptide pour les bicouches d'Egg PC dû au changement structural, cela permet d'expliquer la perte de l'activité biologique.

Constantes de dissociation apparentes K _d (nM)	Peptides dérivés de la glycoprotéine VP7	
	VP7 ₂₃ wt	VP7 ₂₃ Y302P
	1.2	350

Tableau III.4.5.1 : Constantes de dissociation apparentes des différents peptides : Ces constantes proviennent de la combinaison entre l'affinité des peptides pour les membranes (bicouche d'Egg PC) et leur capacité à les perturber.

III.5 Discussion et conclusions

L'étude structurale par dichroïsme circulaire (CD) et résonance magnétique nucléaire (RMN) du domaine C-terminal VP7₂₃ de la glycoprotéine VP7 du rotavirus nous a permis de mettre en évidence dans un premier temps, l'effet de la composition lipidique sur la structure secondaire de ce domaine, puis dans un second temps, d'élucider sa structure atomique dans un mélange équimolaire de solvants organiques et dans un système micellaire souvent utilisé pour mimer les membranes. Ces données structurales sont complémentaires de l'étude effectuée précédemment, partie III.2 (Chapitre III: Résultats), et permettent de mieux comprendre le mécanisme d'action du domaine minimum actif VP7₂₃ lors de l'interaction avec les membranes.

Modulation de la structure secondaire du peptide VP7₂₃ en fonction de la composition lipidique

La différence d'efficacité du peptide VP7₂₃ à perméabiliser les membranes modèles mise en évidence dans la partie III.2 (Chapitre III: Résultats), nous a permis de nous orienter vers une étude préliminaire des structures secondaires par CD de ce peptide dans des systèmes membranaires constitués de différents lipides. Les données obtenues par CD sur le peptide VP7₂₃ dans des SUVs d'extrait cellulaire de foie indique que ce peptide adopte une structure en hélice α faiblement ordonnée et que l'utilisation d'un mélange lipidique constitué uniquement de L- α -phosphatidylcholine (Egg PC) entraîne l'augmentation de l'ellipticité et le décalage spectral des deux minima sur le spectre de CD, ce qui se traduit par une stabilisation en hélice α de la structure préexistante. Le changement conformationnel du domaine minimum d'interaction avec les membranes et son implication dans leur déstabilisation en fonction de leur nature lipidique, pourrait être contrôlé in vivo par interaction avec les membranes des cellules épithéliales intestinales.

Structure du domaine minimum d'activité VP7₂₃ dans des conditions mimant les membranes

Après détermination de l'activité biologique des différents fragments du domaine C-terminal issus de la maturation tryptique de la glycoprotéine VP7 (partie III.2. Chapitre III: Résultats) et l'identification du domaine minimum le plus efficace à perméabiliser les membranes modèles, il nous a semblé important de déterminer les conditions optimales de mise en solution du peptide VP7₂₃ dans un milieu mimant les membranes. L'étude de sa

structure 3D permettra de proposer un mécanisme rendant compte de sa capacité à induire la perméabilisation membranaire. Deux milieux différents ont alors été utilisés pour l'étude structurale par RMN, le premier, composé d'un mélange de $\text{CD}_3\text{OH}/\text{CDCl}_3$ (1/1) et le second constitué de micelles de détergent (DPC). Les micelles de détergent représentent le milieu le plus favorable pour l'étude des protéines membranaires^{294,312,313} ou des peptides³¹⁴⁻³¹⁶ capables d'interagir avec les membranes, bien que ces systèmes micellaires constituent un modèle éloigné de la bicouche des biomembranes.

Nous avons tout d'abord enregistré les spectres du peptide VP7₂₃, dans les micelles de DPC, à 293K et nous avons pu observer une augmentation de la largeur de raie due certainement à un temps de corrélation élevé des peptides en présence des micelles et en raison de sa propension à s'agréger. Cette largeur de raie est plus importante que celle observée dans les spectres réalisés dans le mélange $\text{CD}_3\text{OH}/\text{CDCl}_3$ (1/1) enregistrés à la même température. L'augmentation de la température à 323K a permis d'obtenir un affinement des raies et des spectres RMN interprétables. D'autre part, il semblerait que l'augmentation de la concentration en DPC entraîne la diminution des largeurs des raies, il est donc probable que les molécules de DPC diminuent les associations intramoléculaires entre peptides et aident donc à sa solubilisation.

Les données RMN obtenues pour le peptide VP7₂₃ en présence du mélange $\text{CD}_3\text{OH}/\text{CDCl}_3$ (1/1) et des micelles de DPC_{d38} indiquent que ce dernier adopte une structure en hélice α qui s'étend du résidu W292 au résidu M310. Cette structure est caractérisée par une face hydrophobe et une face hydrophile de part et d'autre de l'axe de l'hélice suggérant une fonction spécifique de ces résidus au sein de cette structure au cours du mécanisme d'action ainsi qu'un rôle dans sa fonction biologique. Ces données confortent les résultats obtenus par PWR (Chapitre III: Résultats, partie III.2.3, paragraphe III.2.3.5) qui montrent l'importance de la contribution des interactions électrostatiques dans l'efficacité des peptides dérivés de la maturation tryptique de la glycoprotéine VP7 à déstabiliser les membranes modèles. Il est donc possible que la première étape du mécanisme d'action de ces peptides, soit une interaction électrostatique impliquant les chaînes latérales des résidus constituant la face hydrophile de cette hélice amphipathique et les têtes polaires des lipides comme cela a déjà été décrit dans la littérature^{188,199,286-288} et illustré dans la Figure III.5.1. Généralement ces interactions électrostatiques entraînent une accumulation des peptides suffisamment importante à la surface des membranes pour induire leur déstabilisation. Cependant il ne faut pas négliger les interactions hydrophobes puisque Dathe et Wieprecht ont montré que la

diminution des interactions électrostatiques par diminution des charges engendre une diminution de l'affinité du peptide et que ce sont les interactions hydrophobes dans ce cas qui prennent le dessus³¹⁷. En effet la face hydrophobe du peptide permet son insertion au cœur de la bicouche lipidique et accélère le processus de perméabilisation membranaire.

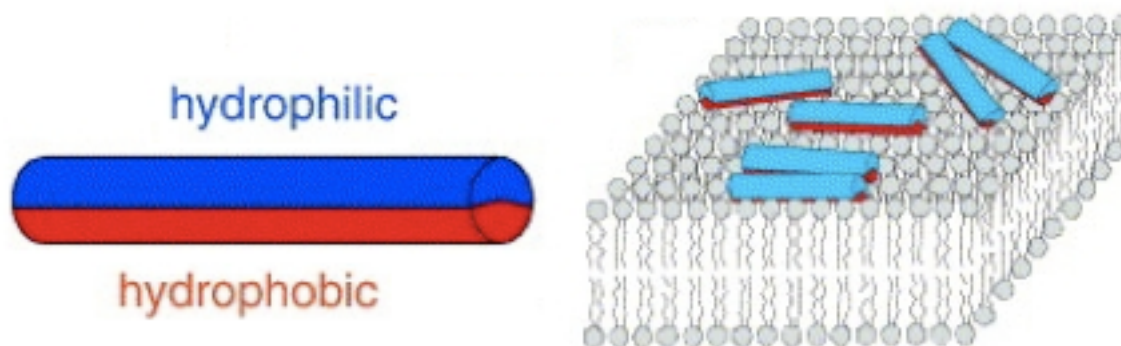


Figure III.5.1 : Schéma représentatif de l'étape initiale du mécanisme d'action des peptides au niveau de la membrane (Salditt et al. 2006). Le peptide est représenté ici schématiquement par un cylindre possédant une face hydrophobe (rouge) et une face hydrophile (bleu).

Les acides aminés critiques dans la fonction du domaine minimum d'interaction avec les membranes

Nous avons comparé la structure du peptide VP7₂₃ obtenue par RMN avec celle du domaine correspondant dans la protéine native VP7, dont la structure a été déterminée par cristallographie aux rayons X par Aoki³³. Nous avons déterminé que la différence fondamentale entre ces deux structures résidait dans l'existence d'un coude au centre de l'hélice s'étendant du résidu D301 au résidu V303 n'apparaissant plus dans la structure de VP7₂₃ résolue par RMN. Nous proposons que la maturation par la trypsine de la glycoprotéine VP7 au niveau de la K290, entraîne la suppression de ce coude et le redressement de l'hélice et l'exposition des deux faces hydrophobe et hydrophile qui procurerait au peptide VP7₂₃ son activité destabilisatrice.

Suite à cette observation, nous nous sommes intéressés à l'effet de cette courbure sur l'activité biologique du peptide VP7₂₃. Nous avons voulu montrer que le redressement de l'hélice α après maturation par la trypsine est nécessaire pour que ce peptide acquière son

activité. Nous avons procédé à la substitution des résidus impliqués dans la formation du coude et hautement conservés dans les séquences de la glycoprotéine VP7 de différents groupes et stéréotypes de rotavirus. Les résidus Y302 ou D301 ont été substitués par une proline afin d'engendrer la formation d'un coude au centre du peptide et nous avons testé leur activité.

La mutation introduite dans le peptide VP7₂₃Y302P entraîne une interruption de l'hélice en son centre et affecte son activité biologique et son aptitude à perméabiliser les membranes alors que le peptide muté VP7₂₃D301P adopte une structure hélicoïdale, prédite, sans interruption entre les résidus F296 à K312, pouvant expliquer le maintien de son activité biologique même si celle-ci est plus faible que celle du peptide sauvage.

Interprétation des relations structure-fonction du domaine minimum d'interaction avec les membranes

L'ensemble des résultats obtenus et des données structurales permettent d'établir un modèle potentiel des relations entre la structure et la fonction du peptide VP7₂₃. La structure de VP7₂₃ en hélice α amphipathique, l'analyse in silico de sa séquence et sa capacité à perméabiliser les membranes confirme son homologie avec un grand nombre de peptides lytiques, perforateurs de membranes. La diversité de ces peptides est telle qu'il est difficile de les classer¹⁸⁸ cependant, ils se caractérisent souvent par des structures tridimensionnelles soit en hélice α , soit en feuillet β stabilisé par un ou plusieurs ponts disulfures ou bien par une combinaison de ces deux types de structures^{195,318}. Les peptides lytiques les plus étudiés sont des peptides en hélice α amphiphiles.

Les travaux effectués par différents groupes ont mis en évidence la diversité des espèces qui possèdent cette catégorie de peptides. En effet les peptides perforateurs des membranes ont été détectés chez l'homme^{319,320}, les virus, les champignons, les insectes, les amphibiens ou encore les nématodes³²¹. Il est important de noter que ces peptides ne sont généralement pas structurés en milieu aqueux mais adoptent une structure secondaire en hélice α , une ou plusieurs hélices, dans des milieux mimant la membrane ou bien au contact des membranes, comme nous l'avons montré au cours de ce travail pour les peptides dérivés de la maturation par la trypsine de la glycoprotéine VP7.

Il existe une grande diversité d'espèces (virus, insectes, champignons, homme, ...) produisant les peptides lytiques en hélice α amphiphile et leur mécanisme d'action est à l'heure actuelle bien décrit dans la littérature. Différents mécanismes²⁰⁰ ont été proposés à

partir des études effectuées sur des peptides de référence tel que la méliittine, la magainine, la cercropine ou autres dont les plus répandus ont été regroupés sous l'appellation¹⁸⁸ « modèle SMH » pour Shaï-Matsuzaki-Huang.

Quelque soit leur mode d'action, les peptides lytiques ne sont actifs qu'à partir d'une concentration minimale d'interaction (CMI). Lorsque la concentration du peptide est faible, la première étape du mécanisme d'interaction est caractérisée par l'adsorption et l'orientation du peptide parallèlement à la membrane, alors qu'une augmentation du rapport peptide/lipide entraîne la réorientation du peptide par rapport à l'interface comme décrit dans la littérature.^{209,210} Il est important de noter que cette étape est également dépendante du taux d'hydratation de la membrane^{207,208} et de la composition lipidique²⁰⁶.

Cette première étape commune à tous les mécanismes proposés est appelée²¹⁰ « modèle à deux états »²⁰⁹, la transition décrite par ce modèle est considérée comme une conséquence des variations de l'énergie d'adsorption à la membrane suite à l'accumulation des peptides.

A l'heure actuelle, en raison des propriétés lytiques du peptide VP7₂₃, structuré en hélice α amphipathique et en raison de ses propriétés physico-chimiques et de la nature de ses interactions avec la membrane, quatre mécanismes d'action peuvent être proposés décrivant son activité: le modèle tapis, le modèle du pore en tonneau, le modèle du pore mixte ordonné ou désordonné et le modèle du radeau naufrage.

Le modèle de tapis ou détergent « carpet-like model » : au cours de ce processus de grandes quantités de peptides s'orientent parallèlement à la membrane, forment un tapis à sa surface et perturbent son organisation en agissant comme un détergent. Il en résulte ainsi la formation de micelles (Figure III.5.2. A).

Le modèle du pore en tonneau « barrel-stave model » : après la première interaction des peptides avec la membrane lipidique, les hélices α amphipathiques forment des pores membranaires de telle façon que les chaînes latérales hydrophobes s'alignent avec les chaînes alkyles des lipides, tandis que les chaînes latérales des résidus hydrophiles constituent le coeur des pores (Figure III.5.2. B).

Le modèle du pore mixte ordonné ou désordonné « toroidal pore » : les hélices α amphipathiques, dans ce cas, s'insèrent perpendiculairement à la membrane et s'agencent de façon à ce que les chaînes latérales des résidus polaires interagissent avec les têtes polaires des lipides, entraînant ainsi une courbure positive des membranes (Figure III.5.2. C) suivie de la formation de pores. Il est également possible d'observer des pores mixtes désordonnés

formés par l'insertion des hélices sans orientation préférentielle sur la membrane (voir introduction).

Le modèle du radeau coulant « *sinking-raft model* » : dans ce cas les peptides en hélices α amphipathiques se répartissent de façon hétérogène parallèlement à la surface de la membrane générant ainsi un déséquilibre de masses à travers la bicouche lipidique avec une augmentation conséquente de la courbure membranaire. Il résulte de ce phénomène la translocation du peptide à travers la bicouche et la formation d'un pore transitoire tel que décrit dans la littérature pour le peptide antimicrobien d'origine bactérienne la δ -lysine^{202,203} et illustré dans la Figure III.5.2. D.

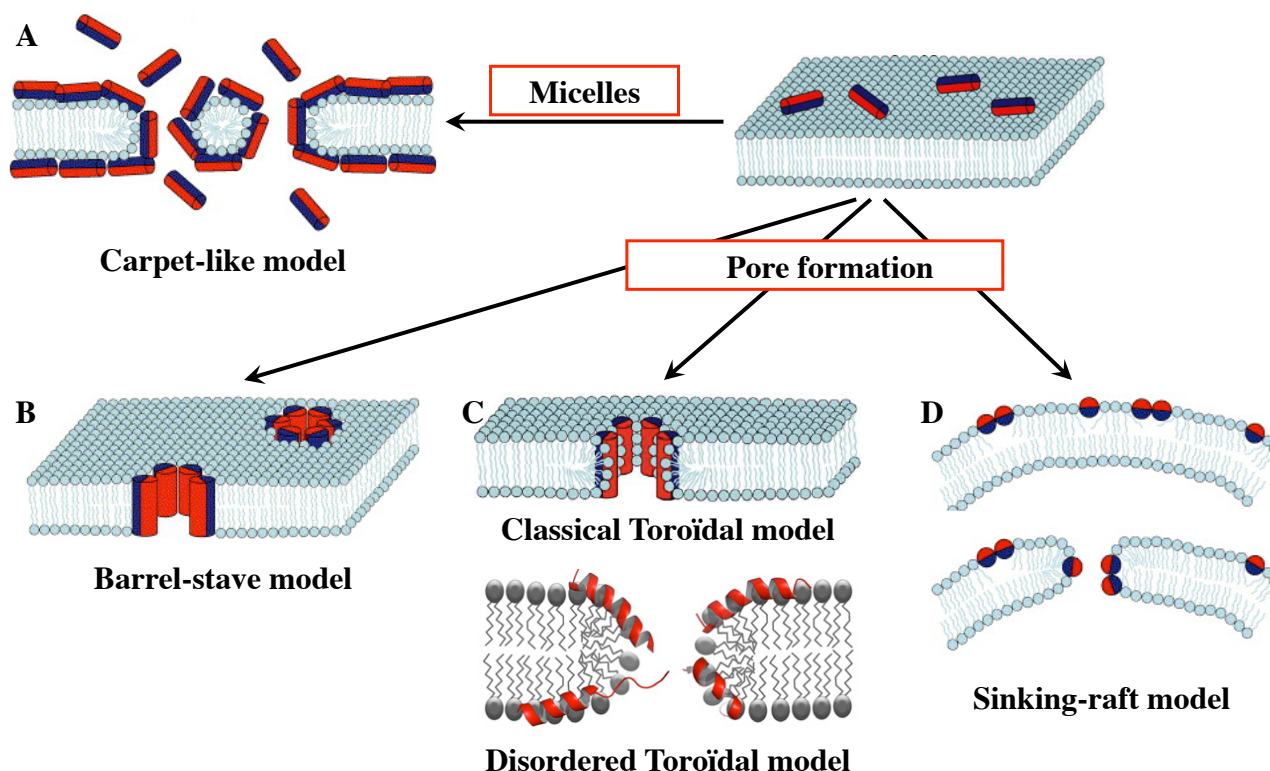


Figure III.5.2 : Schéma représentant les différents modes d'action des peptides lytiques A, B, C et D (Chan et al. 2006 ;Sengupta et al. 2008). Chaque mécanisme est précédé par l'association des peptides avec les membranes de sorte que les faces hydrophiles de chaque hélice (rouges) interagissent avec les têtes polaires tandis que les faces hydrophobes (bleues) s'insèrent dans la bicouche lipidique. **A.** modèle du détergent **B.** modèle du pore en tonneau. **C.** modèle du pore toroïdal ordonné ou désordonné. **D.** modèle du radeau naufrage.

Les résultats obtenus ne nous permettent pas de distinguer entre ces différents mécanismes, néanmoins nous avons effectué des expériences supplémentaires afin de faire la différence entre un mécanisme entraînant la formation de pores et le modèle détergent qui conduit à la formation des micelles, correspondant à des systèmes membranaires de petits

diamètres. Ces expériences avaient pour but d'estimer par diffusion dynamique de la lumière (DLS) le rayon hydrodynamique des LUVs à 150 μM d'Egg PC et de diamètre de l'ordre de 100 nm, en absence et en présence d'une concentration croissante de VP7₂₃. Il est important de noter que le rayon hydrodynamique est inversement proportionnel au coefficient de diffusion D, des LUVs ou des micelles.

L'analyse des résultats obtenus par diffusion de la lumière nous a permis d'observer une croissance du rayon hydrodynamique avec l'augmentation de la concentration du peptique puis une saturation à 1 μM de peptide (Figure III.5.3). Cette hausse est certainement liée à l'augmentation du volume des LUVs après addition du peptide qui s'insère dans la membrane pour former probablement des pores, puisque à une concentration de 1 μM en peptide, les tests de perméabilité indiquent une perméabilisation totale des membranes.

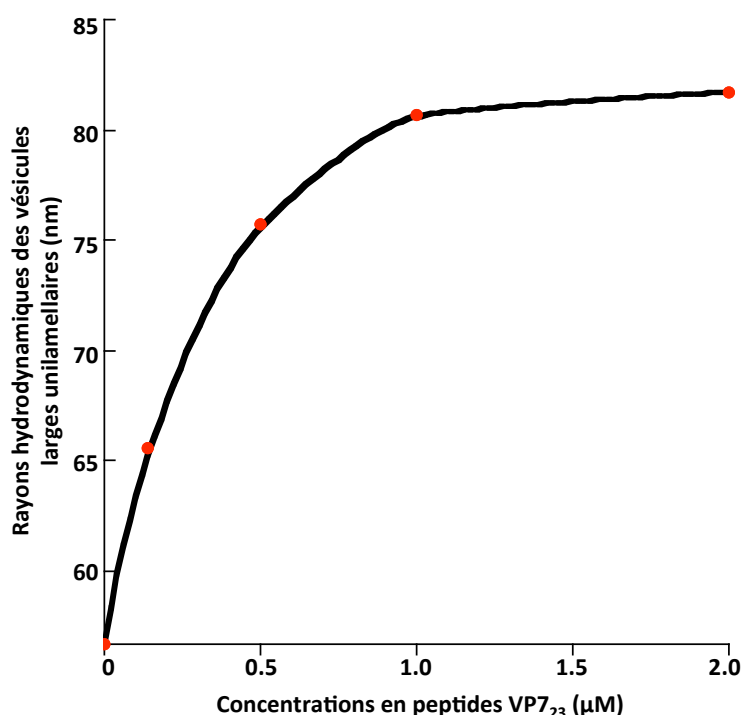


Figure III.5.3 : Schéma représentant la variation du rayon hydrodynamique des LUVs d'Egg PC en fonction de la concentration en peptide VP7₂₃.

La DLS ne nous a pas permis de déterminer par quel mécanisme VP7₂₃ fait des pores dans la membrane cependant nous avons pu discriminer entre les deux mécanismes, le type « carpet-like » qui conduit après destruction de la membrane à la formation de micelles et le

mécanisme de formation de pores « barrel-state model », « toroïdal pore » et le « sinking-raft model ».

Des données supplémentaires sur le mode d'insertion du peptide VP7₂₃ seraient importantes pour établir le mode d'action de ce peptide. La distinction entre les mécanismes de formation de pores mixtes désordonnés ou du radeau coulant d'une part et les mécanismes de formation des pores mixtes ordonnés ou de pores en tonneau d'autre part, devrait être mise en évidence par l'étude de ce peptide en présence de bicelles, par RMN du solide. Cela est en cours en collaboration avec Dror Warshowski, (IBPC, Paris).

Chapitre IV: Conclusions générales

IV. Conclusions générales

Mon travail de thèse avait pour principal objectif de déterminer le rôle d'un peptide comprenant les 61 acides aminés C-terminaux de la glycoprotéine VP7, fragment non trypsique potentiellement impliqué dans l'entrée cellulaire du rotavirus.

Ceci m'a conduit dans un premier temps, à l'identification de quatre fragments tryptiques situés du côté C-terminal de VP7 que sont VP7₄₃, VP7₃₆ et VP7₂₃ comportant un domaine prédit en hélice membranaire et le peptide et VP7₁₃.

La caractérisation de l'activité biologique des quatre fragments tryptiques C-terminaux de VP7, m'a permis de montrer que seulement trois de ces fragments, VP7₄₃, VP7₃₆, VP7₂₃, avaient la capacité d'interagir avec les membranes modèles, avec une affinité variable en fonction de la composition lipidique. Plus important encore, ces peptides avaient la capacité de déstabiliser les membranes avec une efficacité qui varie en fonction de la séquence peptidique.

Par la suite, des études par RMN et modélisation moléculaire, ainsi que différentes techniques biophysiques et biochimiques telles que la PWR, le dichroïsme circulaire, la DLS, l'infrarouge à transformée de Fourier, des expériences de perméabilisation de LUVs et de SUVs, ont été entreprises, afin de comprendre et tenter de caractériser le mécanisme selon lequel, ces peptides induisent la perméabilisation des membranes.

Enfin, les différents résultats obtenus au cours de cette étude, combinés à une analyse bibliographique, m'ont amenée à proposer un mécanisme d'entrée du virus, impliquant les fragments tryptiques de la glycoprotéine VP7.

Caractérisation d'un domaine d'interaction avec les membranes

Nous avons mis en évidence par analyse *in silico* de la séquence primaire de la glycoprotéine VP7, l'existence d'un domaine prédit en hélice membranaire. Ce dernier est situé du côté C-terminal et est relativement court. De plus, nous avons constaté que ce dernier domaine très conservé est entouré de part et d'autre par des résidus arginine et lysine, hautement conservés parmi les différentes souches de rotavirus et probablement reconnus par le site catalytique de la trypsine.

La présence de tels domaines dans chaque monomère de VP7, 780 molécules de VP7, qui constitue la capside externe de la particule virale, nous a conduit à penser qu'ils pouvaient jouer un rôle important dans l'étape d'entrée du virus dans la cellule hôte. Cette hypothèse est confortée par des études préalables, publiées par Charpilienne et al¹²⁸. Leurs travaux indiquent que des pseudo-particules virales VLP2/6/7, traitées par la trypsine en présence d'agent chélatant du calcium « EGTA », induisent la perméabilisation des vésicules multilamellaires (MLVs) contenant de la 6-CF. Alors que, les pseudo-particules virales VLP2/6, ayant subi le même traitement, n'ont aucun effet sur les membranes. Ils suggèrent ainsi l'implication de fragments tryptiques de VP7 dans la déstabilisation des membranes, lors de l'entrée du virus dans la cellule hôte.

L'implication de la protéine VP4 et en particulier de son domaine VP5* dans la perméabilisation des membranes et dans l'entrée du rotavirus ayant déjà été démontrée, il est envisageable que VP7 et en particulier les fragments tryptiques agissent de concert avec VP5*.

Caractérisation fonctionnelle des peptides dérivés de la glycoprotéine VP7, après maturation

L'analyse in silico nous a conduit à l'identification et la synthèse de quatre fragments tryptiques, VP7₄₃, VP7₃₆, VP7₂₃, VP7₁₃. Ces fragments ont été testés pour leur capacité à déstabiliser les membranes modèles des LUVs, contenant un marqueur fluorescent, la 6-CF. Les résultats montrent que ces peptides, à l'exception du peptide VP7₁₃, sont capables de perméabiliser les LUVs et que leur efficacité à déstabiliser les membranes est fonction d'une part de la concentration en peptide et d'autre part de la composition en lipides. Les constantes de dissociation apparentes caractéristiques de l'interaction peptide-membrane ont été déterminées par PWR.

Le résultat marquant de notre étude a été de démontrer que l'affinité des peptides pour les membranes et leur efficacité à les déstabiliser est fonction de la taille de la séquence peptidique contenant le domaine prédit en hélice membranaire. Nous avons montré que le peptide minimum d'interaction avec les membranes, VP7₂₃, possède la plus grande affinité et la plus grande activité et que le rapport d'affinité avec le peptide tryptique le moins efficace à déstabiliser les membranes « VP7₄₃ » est égal à 43.

L'étude de l'interaction peptide-membrane entreprise par PWR sur des bicouches modèles constituées d'un mélange 80 % d'Egg PC et de 20 % de didécyldiméthylammonium bromide (DDAB) et comportant des charges positives introduites par le DDAB, nous ont permis de démontrer l'importance et la contribution des interactions électrostatiques, durant les premières étapes de l'interaction des peptides avec la membrane. Nous avons ainsi suggéré que la première étape du mécanisme d'action de ces peptides est caractérisée par des interactions électrostatiques entre la face hydrophile du peptide et les têtes polaires de la membrane.

Nous avons également montré que la présence de cholestérol induit une baisse de l'affinité des peptides pour les membranes. Cela pourrait être expliqué par les propriétés du cholestérol modifiant les propriétés dynamiques de la membrane et indirectement les interactions et l'affinité de ces peptides pour les lipides. Des résultats similaires ont été obtenus par Ramamoorthy et al²⁸³ qui ont montré que la perte de l'efficacité de la paradaxine en présence du cholestérol, peptide antimicrobien isolé de la sole, est dû à une réduction de l'angle d'inclinaison de l'hélice C-terminale amphipathique du peptide par rapport à la bicouche normale (pour plus de détail voir paragraphes ,Partie III.2, Chapitre III: Résultats).

Caractérisation structurale du peptide minimum d'interaction avec les membranes, VP7₂₃

Les études structurales par dichroïsme circulaire du peptide VP7₂₃, utilisant différentes compositions et systèmes lipidiques, nous ont permis d'observer les changements conformationnels de ce peptide, associés à la nature des lipides utilisés. Ces résultats laissent à penser que le peptide en interaction avec les LUVs d'Egg PC adopte une conformation en hélice α . Cette conformation est également observée en présence de micelles de DPC.

Les études par RMN du peptide VP7₂₃ en présence de micelles de DPC indiquent une organisation structurale en hélice α amphiphile qui s'étend du résidu W293 au résidu M310, caractéristique des peptides perforateurs des membranes. De plus, la comparaison de la structure du peptide VP7₂₃ obtenue par RMN avec le domaine correspondant dans la protéine native, dont la structure a été déterminée par cristallographie aux rayons X³³, met en évidence une courbure de l'hélice en son centre, entre les résidus D301 et V303 hautement conservés, dans la structure native. Nous en avons donc conclu que la maturation par la trypsine de la glycoprotéine VP7 au niveau de la K290, induit certainement la rupture des interactions

hydrophobes entre les chaînes latérales des résidus M285 et I306 du peptide et le reste de la molécule. La suppression de ces contacts, qui entraînent des tensions au niveau de l'hélice dans la protéine native rendent la face hydrophobe inaccessible, induit un redressement de l'hélice fortement courbée et l'exposition des deux faces hydrophobe et hydrophile.

Les résultats obtenus par comparaison entre la structure RMN de VP7₂₃ et son domaine équivalent dans la protéine native, nous ont conduit à comprendre l'importance de la maturation de la protéine native VP7 et l'effet de la courbure observée sur l'activité biologique du peptide VP7₂₃. Ceci nous a permis de proposer et de caractériser deux mutants du peptide VP7₂₃. Le premier, VP7₂₃Y302P, est inactif pour la déstabilisation des membranes et le second, VP7₂₃D301P, présente une affinité et une efficacité réduite pour la perméabilisation membranaire par rapport au peptide sauvage correspondant.

Modèle hypothétique d'un mécanisme d'entrée du rotavirus, impliquant des fragments tryptiques de la glycoprotéine VP7

Le mécanisme d'infection des entérocytes matures par le rotavirus est un processus qui se déroule en plusieurs étapes : clivage par la trypsine de la protéine VP4 en VP8* et VP5*, attachement cellulaire, solubilisation de la capsid externe, perméabilisation des membranes endosomales et internalisation des particules virales infectieuses DLPs dans le cytoplasme.

Bien que l'implication des protéines VP4 et VP7 au cours des différentes étapes d'attachement cellulaire soit bien décrite, le mécanisme selon lequel ces protéines permettent la translocation des particules virales dans le cytoplasme reste toujours en discussion. Néanmoins, l'équipe de Harrison et Dormitzer, ont proposé un modèle structural expliquant les différents changements conformationnels de la protéine VP4 (VP5* + VP8*), permettant au domaine VP5* de déstabiliser les membranes. Cependant, compte tenu du nombre de protéines VP7, 780 copie, formant la capsid externe et des études réalisées dans le cadre de ma thèse, on ne peut pas négliger la possibilité d'une implication probable de VP7 dans la déstabilisation des membranes endosomales, sans exclure celui de VP5* et permettant ainsi, la translocation des particules virales dans le cytoplasme. Ainsi, nous proposons un mécanisme selon lequel la perméabilisation des membranes endosomales est dû à l'action simultanée de la protéine VP5* et des fragments tryptiques de VP7, comme nous l'avons illustré dans la Figure IV.1, ci-dessous. Ce mécanisme serait la résultante d'une série d'interactions, impliquant différentes protéines à travers différentes étapes.

Etape 1 : maturation de la protéine VP4

La protéolyse de VP4 en VP8* et VP5* s'effectue au niveau du tube digestif au cours de l'infection. Cette étape cruciale pour l'entrée du virus, induit une excision des résidus 232 à 247 suivie de changements conformationnels. Il en résulte ainsi une amélioration de l'infectivité virale facilitant l'entrée du virus dans les cellules

Etape 2 : attachement cellulaire

Plusieurs éléments laissent à penser que le rotavirus interagit séquentiellement avec plusieurs récepteurs cellulaires par l'intermédiaire des protéines VP4 et VP7 de la couche externe. L'ensemble des travaux effectués afin de déterminer les différentes étapes, suggèrent que le premier contact du virus avec la surface cellulaire s'effectue par interaction de la protéine VP8* avec les récepteurs cellulaires contenant l'acide sialique. Après ce premier contact avec l'acide sialique, le virus interagit par le biais du domaine VP5* avec le récepteur $\alpha 1\beta 2$ et la protéine Hsc 70, puis VP7 se lie aux récepteurs $\alpha \nu \beta 3$ et $\alpha \nu \beta 2$. Il résulte de ce processus l'encapsidation des particules virales dans des vésicules d'endocytose.

Etape 3 : solubilisation de la capside externe et déstabilisation des membranes endosomales

La perméabilisation de la membrane endosomale par l'action simultanée des protéines VP5* et VP7, nécessite dans un premier temps la solubilisation de la capside externe de la particule virale. Cette dernière est constituée de trimères de VP7 stabilisés par les ions calcium et de 60 spicules de VP4 (VP5*+VP8*) ancrés au niveau des canaux de type II. Chaque trimère de VP4 (spicule) interagit, au niveau de chaque canal d'ordre II, avec trois sous unités différentes de VP7, appartenant à trois trimères différents³².

L'interaction de la protéine VP4 (VP5* + VP8*) avec les récepteurs cellulaires, entraîne des changements conformationnels, conduisant à la perte du domaine VP8* lors de l'entrée dans la cellule et l'apparition de la forme active de VP5*, forme induisant la déstabilisation de la membrane et qui reste fixée à la capside externe^{36,37,159}.

La baisse de la concentration progressive du calcium dans l'endosome primaire, d'une concentration extracellulaire de 1 mM à une concentration intracellulaire de 100 nM³²², par

simple diffusion à travers les canaux calcium ou par transport actif est accélérée par le gradient électrochimique généré par les pompes à protons¹⁵⁸. Il en résulte alors la dissociation de la capside externe par passage de la forme trimérique de VP7 à sa forme monomérique, la libération des protéines VP5* et VP7, la maturation des monomères de VP7 par la trypsine, libérant ainsi les fragments tryptiques C-terminaux, qui vont à leur tour participer à la déstabilisation de la membrane endosomale, conduisant à l'osmolyse.

Il est important de remarquer ou de rappeler que dans les TLPs, le domaine C-terminal de VP7 induisant la déstabilisation des membranes endosomales, correspond à l'hélice H4 (W289 à V309) impliquée dans l'assemblage de la protéine VP7 sur la capside intermédiaire VP6, par interaction avec les boucles D'D" et HαA du domaine H de VP6³² (pour plus de détails voir paragraphe I.1.4.2.5, Chapitre I: Introduction générale). La solubilisation de la capside externe entraînerait donc l'exposition de cette hélice H4 qui pourrait être libérée par clivage par la trypsine.

En outre, il est possible que la solubilisation partielle de la capside externe des particules virales puisse induire l'exposition de la protéine VP5*, qui pourrait former un pore dans la membrane participant ainsi à la libération du calcium dans le cytoplasme. Cette hypothèse est fondée sur les travaux de Golantsova et al, qui démontrent que les formes tronquées de VP5* induisent une augmentation de la perméabilité du calcium dans les cultures cellulaires³²³.

Etape 4 : translocation des particules virales infectieuses dans le cytoplasme

La translocation des particules virales infectieuses dans le cytoplasme est la résultante de l'osmolyse cellulaire due à la variation de la pression osmotique causée par les pores formés à la surface des membranes par VP5* et les fragments tryptiques de VP7.

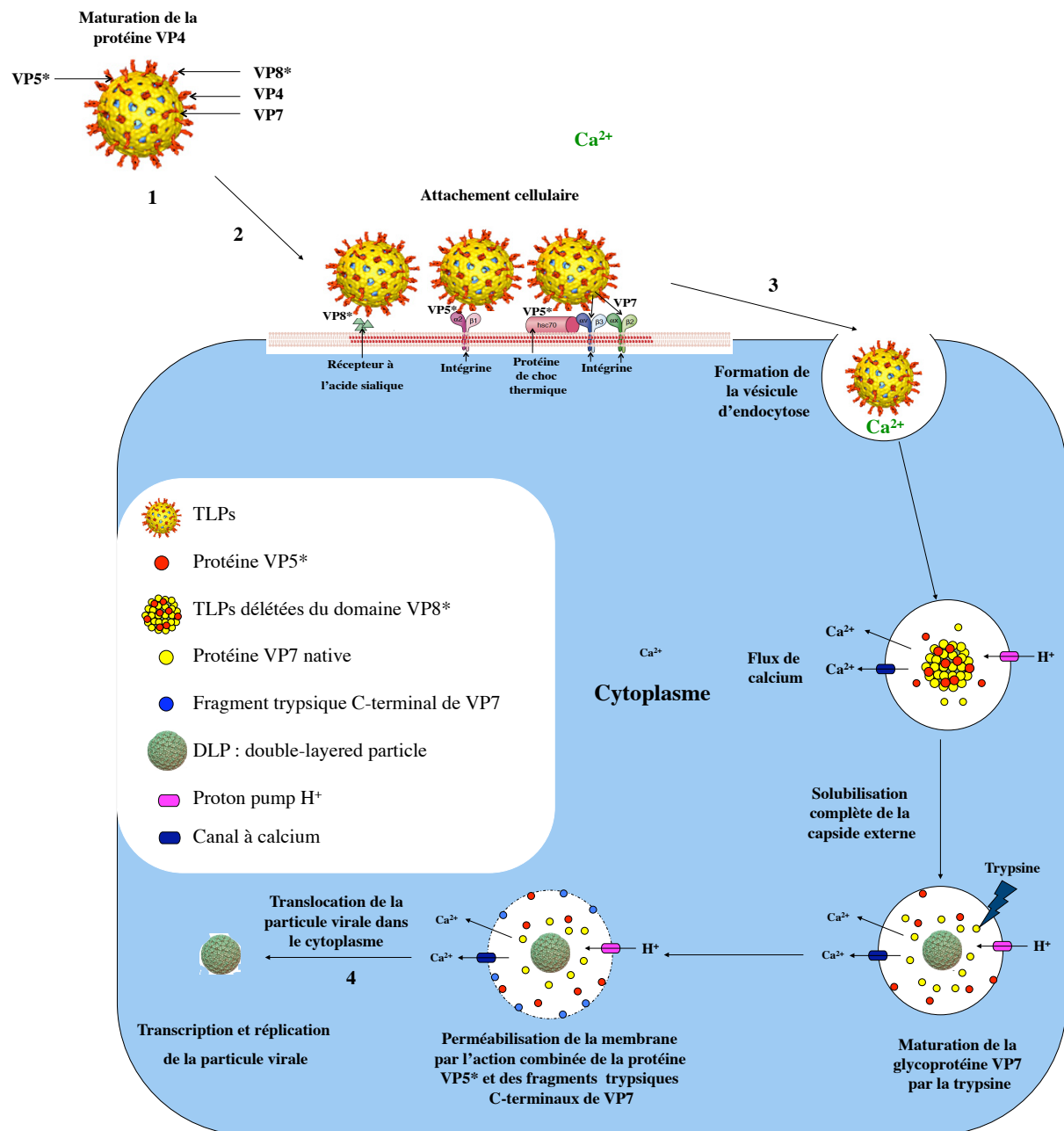


Figure IV.1 : Modèle hypothétique du mécanisme d'entrée du rotavirus par endocytose dans les cellules cibles, impliquant les fragments tryptiques C-terminaux de la glycoprotéine VP7.

Suite aux résultats exposés dans cette thèse, nous avons proposé un mécanisme hypothétique selon lequel l'action combinée des fragments tryptiques de VP7 et de la protéine VP5* induisent de façon concomitante la translocation des DLPs dans le cytoplasme. Des données supplémentaires sont évidemment nécessaires pour étayer notre théorie et en premier lieu il serait important d'apporter la preuve de la présence de peptides tryptiques issus de VP7 dans l'endosome. D'autre part il serait important de déterminer de façon précise le mode d'insertion des fragments tryptiques dans la membrane afin d'établir leur mode d'action et proposer un mécanisme moléculaire selon lequel ces peptides lytiques déstabilisent les membranes.

Les expériences de DLS semblent permettre de discriminer entre deux mécanismes, selon lesquels VP7₂₃ peut induire la déstabilisation des membranes, le type « carpet-like » qui conduit après destruction de la membrane à la formation de micelles et le mécanisme conduisant à la formation de pores « barrel-state model », « toroidal pore » et le « sinking-raft model ». Cependant, il est important de tenter de distinguer entre les mécanismes de formation de pores mixtes désordonnés ou du radeau coulant d'une part et les mécanismes de formation des pores mixtes ordonnés ou de pores en tonneau d'autre part. Cette incertitude devrait être levée par l'étude de ce peptide en présence de bicelles, par RMN du solide. Ce travail est en cours en collaboration avec Dror Warshowski à l'IBPC (Paris).

De plus, d'autres questions restent sans réponse. Quel est le degré d'oligomérisation des fragments tryptiques de VP7, conduisant à la formation des pores ou pseudo-pores ? Quelle est la nature des interactions permettant la stabilité du pore ou pseudo pore formé ? Quelle est sa durée de vie ?

La détermination de la durée de vie des pores formés par VP5* et ceux formés par les fragments tryptiques de VP7 permettrait de caractériser le degré d'implication de chacune de ces protéines dans la déstabilisation des membranes, donc son importance dans la translocation des DLPs dans le cytoplasme.

Chapitre V: Annexes

V. Annexes

V.1 Déplacements chimiques du peptide VP7₂₃

V.1.1. Tableau des déplacements chimiques du peptide VP7₂₃ dans le DPC

Residue	δ NH	δ α H	δ β H	Others
W292	7.52	4.43	3.34	
W293	7.19	4.24	3.13, 2.48	
Q294	7.57	4.04	2.08, 1.98	γ CH ₂ * 2.34
V295	7.60	3.86	2.39	γ CH ₃ 1.03, 0.97
F296	8.01	4.17	3.22, 3.14	δ CH ₂ 7.17; ϵ CH ₂ 7.07
Y297	8.19	4.07	3.16, 3.08	δ CH ₂ 7.19; ϵ CH ₂ 6.91
T298	7.85	3.96	4.40	γ CH ₃ 1.26
V299	8.01	3.66	2.32	γ CH ₃ 1.08, 0.91
V300	8.04	3.45	2.04	γ CH ₃ 0.90, 0.74
D301	8.10	4.44	2.91	
Y302	8.13	4.37	3.18, 3.02	δ CH ₂ 7.10; ϵ CH ₂ 6.77
V303	8.54	3.60	2.27	γ CH ₃ 1.09, 0.98
N304	8.53	4.45	2.91, 2.85	
Q305	7.91	4.08	2.29, 2.19	γ CH ₂ 2.52, 2.43
I306	8.10	3.76	2.13	γ CH ₂ 1.79, 1.16; γ CH ₃ 0.95; δ CH ₃ 0.85
I307	8.35	3.65	2.09	γ CH ₂ 1.84; γ CH ₃ 1.15; δ CH ₃ 0.94, 0.87
Q308	8.05	4.06	2.19	γ CH ₂ 2.47, 2.54
L309	7.97	4.17	1.96, 1.70	γ H 1.88; δ CH ₃ 0.94
M310	7.10	4.32	2.30, 2.17	γ CH ₂ 2.85, 2.69
S311	7.84	4.41	4.01, 3.97	
K312	7.69	4.38	1.97, 1.87	γ CH ₂ 1.55, 1.50; δ CH ₂ 1.72
R313	7.80	4.30	1.96, 1.84	γ CH ₂ 1.70; δ CH ₂ 3.23; ϵ NH 7.39

V.1.2. Tableau des déplacements chimiques du peptide VP7₂₃ dans un mélange CD₃OH/CDCl₃ (1/1)

Residue	δ NH	δ αH	δ βH	Others
W292	8.424	4.45	3.46, 3.42	Hε ₃ 7.402; Hζ ₃ 7.50; Hζ ₂ 7.48; εNH 10.46; δH 7.38
W293	7.69	4.29	3.34, 2.75	Hζ ₂ 7.43; εNH 10.43; δH 7.18
Q294	7.34	3.89	1.89, 1.85	γCH ₂ * 2.01
V295	7.43	3.67	2.39	γCH ₃ * 1.08
F296	8.14	4.23	3.25, 3.21	
Y297	8.53	4.14	3.24	δCH ₂ 7.35; εCH ₂ 6.92
T298	7.79	3.98	4.49	γCH ₃ 1.35
V299	8.13	3.69	2.27	γCH ₃ 1.16, 1.04
V300	8.17	3.49	2.03	γCH ₃ 0.96, 0.72
D301	8.43	4.45	3.07	
Y302	8.51	4.24	3.31	δCH ₂ 7.12; εCH ₂ 6.79
V303	8.75	3.50	2.26	γCH ₃ 1.25, 1.06
N304	8.37	4.01	3.03, 2.82	δNH ₂ 7.68, 6.67
Q305	8.35	4.01	2.38, 2.24	γCH ₂ 2.67, 2.40
I306	8.19	3.70	2.11	γCH ₂ 1.43, 1.16; γCH ₃ 0.95; δCH ₃ 0.72
I307	8.48	3.70	2.10	γCH ₂ 1.91; γCH ₃ 1.22; δCH ₃ 0.95
Q308	8.44	4.00	2.29, 2.22	γCH ₂ 2.63, 2.48
L309	8.42	4.13	1.97, 1.87	γH 1.71; δCH ₃ 0.98
M310	8.68	4.30	2.30, 2.17	γCH ₂ 2.85, 2.69
S311	8.10	4.43	4.11, 4.04	
K312	7.79	4.36	2.11	εCH ₂ 2.98; γCH ₂ 1.62; δCH ₂ 1.715
R313	7.84	4.51	2.06, 1.92	γCH ₂ 1.78; δCH ₂ 3.35, 3.26; εNH 7.38

V.2 Analyse structurale et fonctionnelle des peptides VP7₆₁, VP7₄₃, et VP7₃₆

V.2.1. Analyse fonctionnelle

Les résultats obtenus dans la partie III.2 (Chapitre III: Résultats), nous ont permis de mettre en évidence les nombreuses propriétés des peptides dérivés de la maturation tryptique du domaine C-terminal de la glycoprotéine VP7. Comme nous l'avons vu et démontré précédemment (Partie III.1, Chapitre III: Résultats), les peptides VP7₆₁, VP7₄₃, et VP7₃₆ comportent un domaine prédit en hélice membranaire. Ces peptides ont été testés pour leur capacité à perméabiliser les membranes modèles de vésicules larges unilamellaires (LUVs) d'Egg PC ainsi que de vésicules d'extrait cellulaire de foie. Ces dernières possèdent un diamètre d'environ 120 à 140 nm et encapsulent un marqueur fluorescent, la 6-Carboxyfluorescéine (6-CF). Les résultats (Figure V.2.1.1) indiquent que l'efficacité des peptides à perméabiliser les membranes est fonction de la séquence primaire de chaque peptide mais également de la composition membranaire en lipides (voir paragraphe III.2.2.4, partie III.2, Chapitre III: Résultats).

Ces résultats ont été consolidés par la mesure des constantes de dissociation apparentes des interactions peptide-lipides, à l'aide de la spectroscopie de résonance plasmonique aux ondes guidées (PWR). Ces constantes ont été obtenues par analyse des courbes de saturation hyperbolique, qui représentent la variation de l'angle de résonance des polarisations p et s en fonction des concentrations croissantes en peptide injecté (pour plus de détails, voir Chapitre II: Matériels et Méthodes). Les valeurs des constantes de dissociation associées aux différents peptides, VP7₆₁, VP7₄₃ et VP7₃₆, en interaction avec la bicouche d'Egg PC, sont respectivement de l'ordre de 95 nM, 52 nM et 8 nM.

Il apparaît ensuite essentiel de comprendre plus finement la nature des interactions entre membranes et peptides et c'est dans ce but, que j'ai entrepris de déterminer la structure 3D que chaque peptide peut adopter dans des conditions mimant les membranes ou leur environnement.

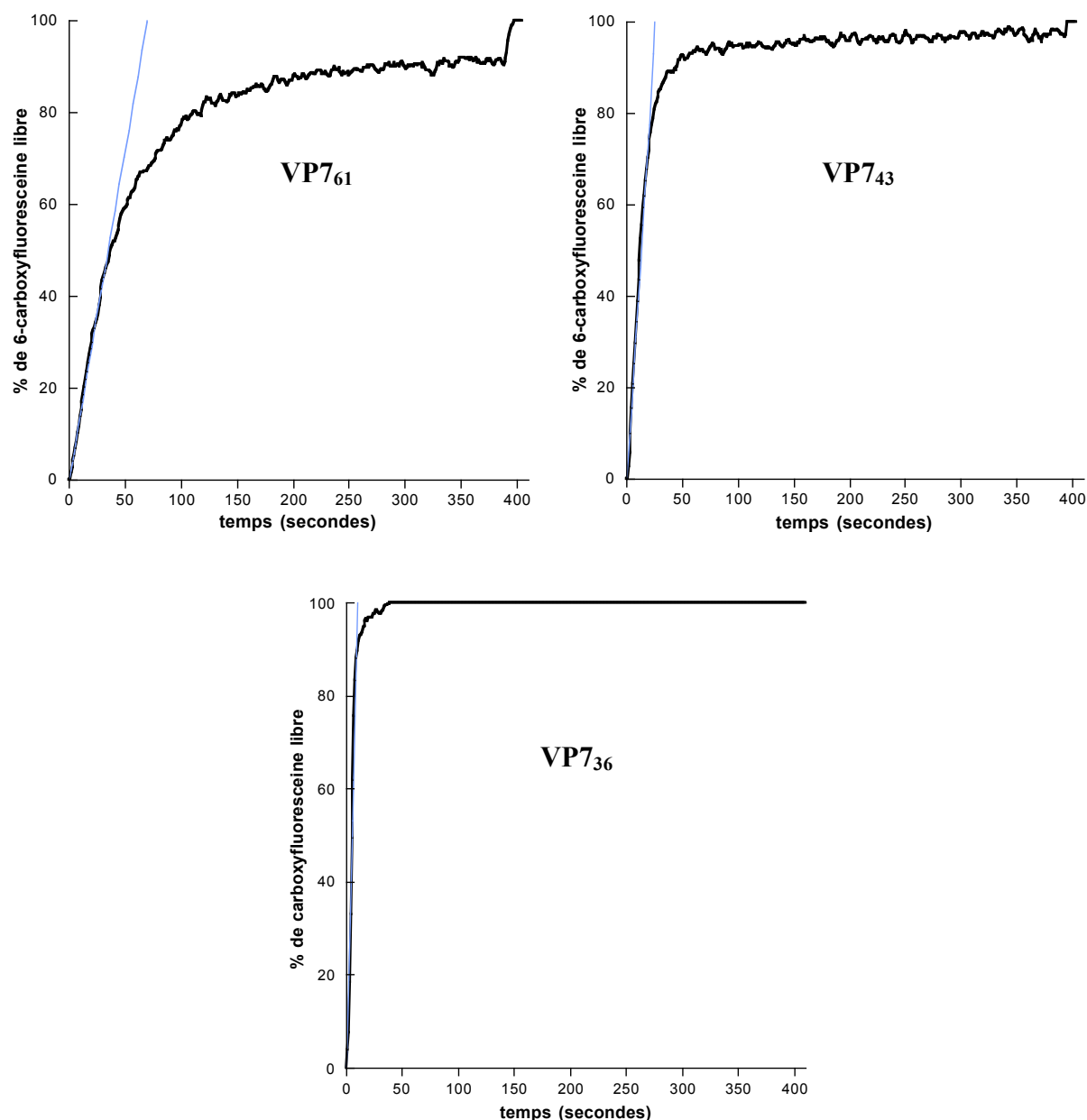


Figure V.2.1.1: Cinétique de libération de la 6-CF dans la solution induite par les différents peptides dérivés de la glycoprotéine VP7 à 1 μM après 400 secondes d'incubation à 37°C. Chaque peptide est ajouté dans la suspension des vésicules larges unilamellaires (LUVs) d'Egg PC à 20 μM dans un tampon PBS 1X (pH = 7.4) au temps $t = 0$. Le 100% d'externalisation de la 6-CF a été déterminé par addition de 10 μL de 10% Triton X-100 dans le milieu réactionnel.

V.2.2. Analyse structurale

L'étude par RMN a été effectuée dans un mélange méthanol-chloroforme et dans des micelles de dodecylphosphocholine, visant à mimer les propriétés hydrophobes des

membranes lipidiques. Les peptides ont été synthétisés et étudiés par RMN comme cela est décrit dans la partie des Matériels et Méthodes.

V.2.2.1 Structure du peptide VP7₆₁

Il existe une très forte corrélation entre l'activité d'un peptide et sa structure. Comme c'est le cas pour beaucoup de peptides lytiques déstabilisateurs de membranes, VP7₆₁ adopte une structure en hélice alpha amphipathique (Figure V.2.2.1.1 et Figure V.2.2.1.2) dans un environnement mimant les membranes.

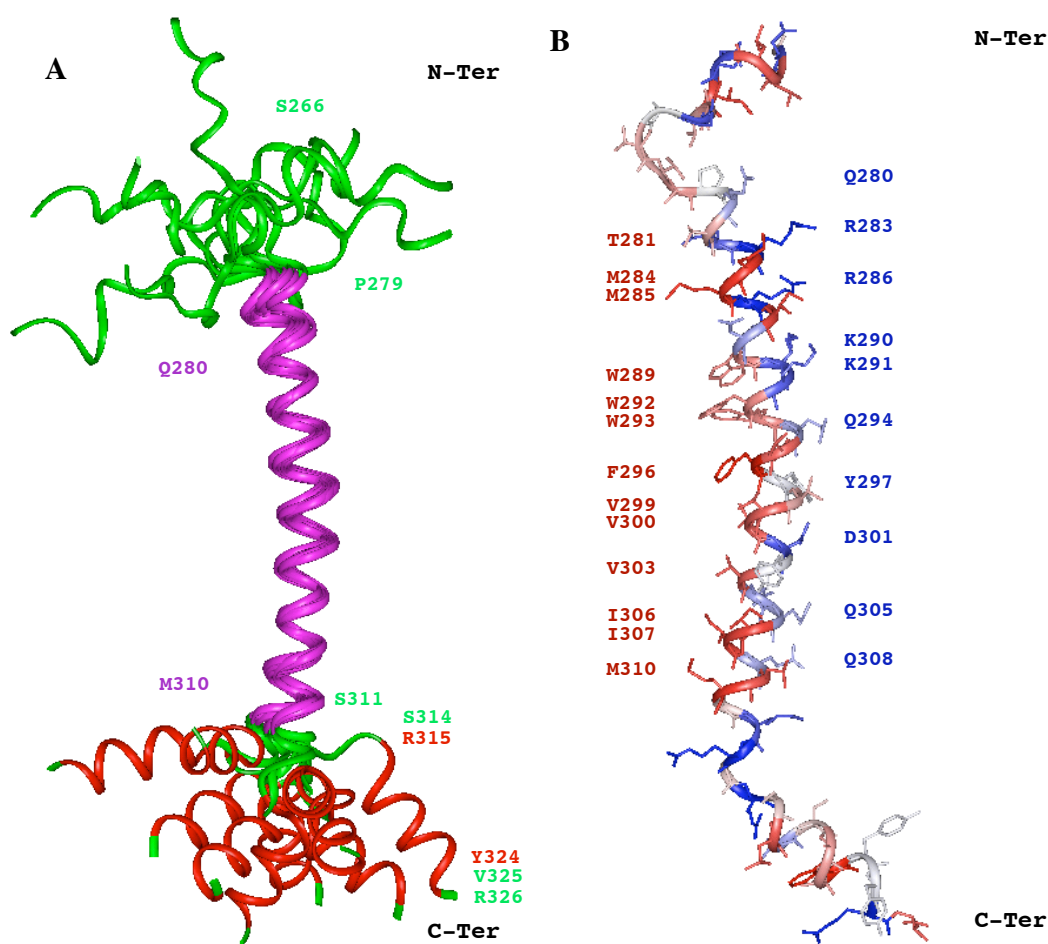


Figure V.2.2.1.1 : Structure du peptide VP7₆₁ déterminée par RMN en présence d'un mélange CD3OH/CDCI3 (1/1).

A. Superposition des 10 meilleures structures, de plus basse énergie, sur les atomes du squelette carboné Q280-M310. **B.** Structure de plus faible énergie, montrant les propriétés amphiphiles de la grande hélice α , couvrant les résidus Q280 à M310. Les résidus sont distingués en fonction du caractère hydrophobe (rouge) ou hydrophile (bleu) des chaînes latérales des acides aminés.

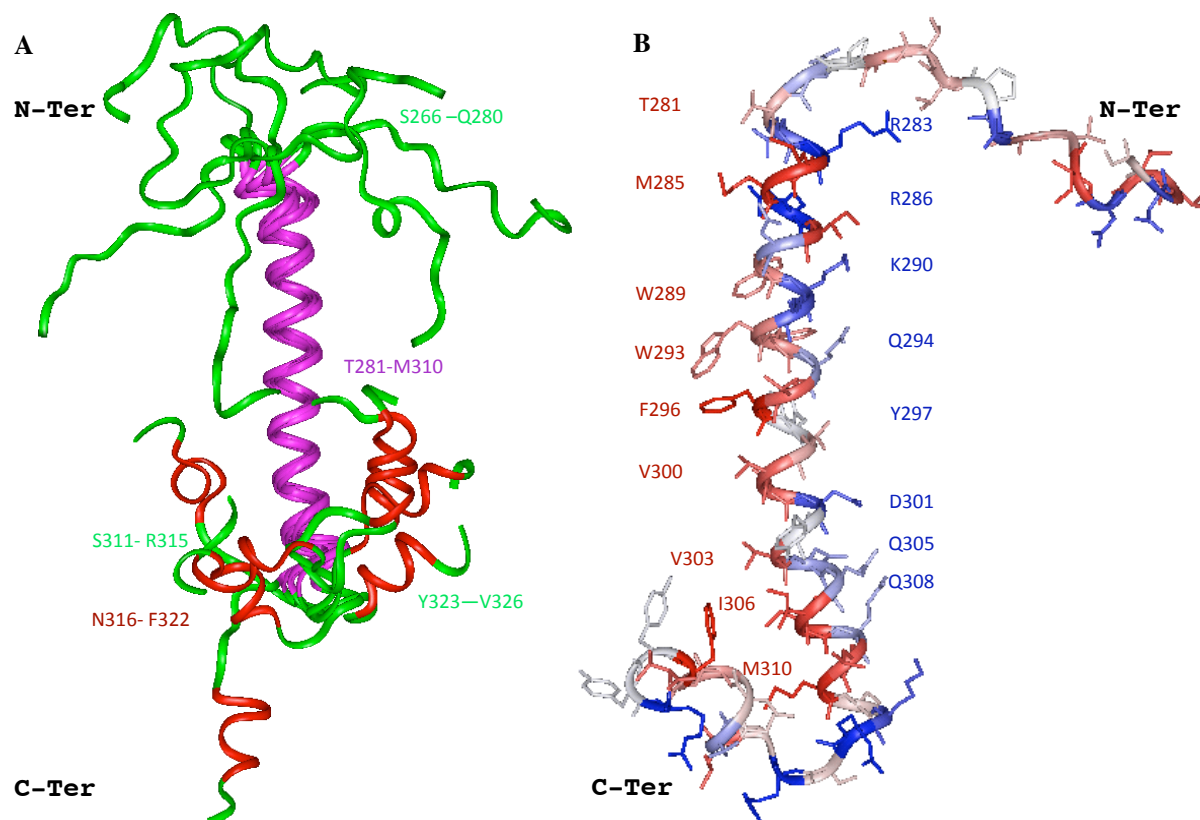


Figure V.2.2.1.2 : Structure du peptide VP7₆₁ déterminée par RMN en présence des micelles de DPC

A. Superposition des 10 meilleures structures, de plus basse énergie, sur les atomes du squelette carboné T281-M310. **B.** Structure de plus faible énergie, montrant les propriétés amphiphiles de la grande hélice α , couvrant les résidus T281 à M310. Les résidus sont distingués en fonction du caractère hydrophobe (rouge) ou hydrophile (bleu) des chaînes latérales des acides aminés.

Il est important à noter que l'hélice α principale, qui s'étend du résidu Q280 au résidu M310 respectivement dans un mélange CD₃OH/CDCl₃ ou dans des micelles de DPC, est bien définie contrairement à l'hélice C-terminale qui est mieux définie dans le mélange CD₃OH/CDCl₃, qu'en présence de DPC. Cette hélice n'apparaît pas dans la structure cristallographique de la protéine VP7 native et est considérée comme étant un domaine flexible.

V.2.2.2 Structure du peptide VP7₄₃

La structure du peptide VP7₄₃ tout comme celle de VP7₆₁ a été déterminée dans deux milieux différents couramment utilisés pour mimer l'environnement hydrophobe des membranes biologiques.

La structure de ce peptide est caractérisée par une grande hélice α amphiphile qui s'étend sur les résidus M285-S311 et W289-M310 respectivement dans CD₃OH/CDCl₃ (1/1) et dans les micelles de DPC. Celle-ci est entourée de deux régions flexibles et terminée par une petite hélice α comportant les 9 ou les 6 résidus C-terminaux (Figure V.2.2.2.1).

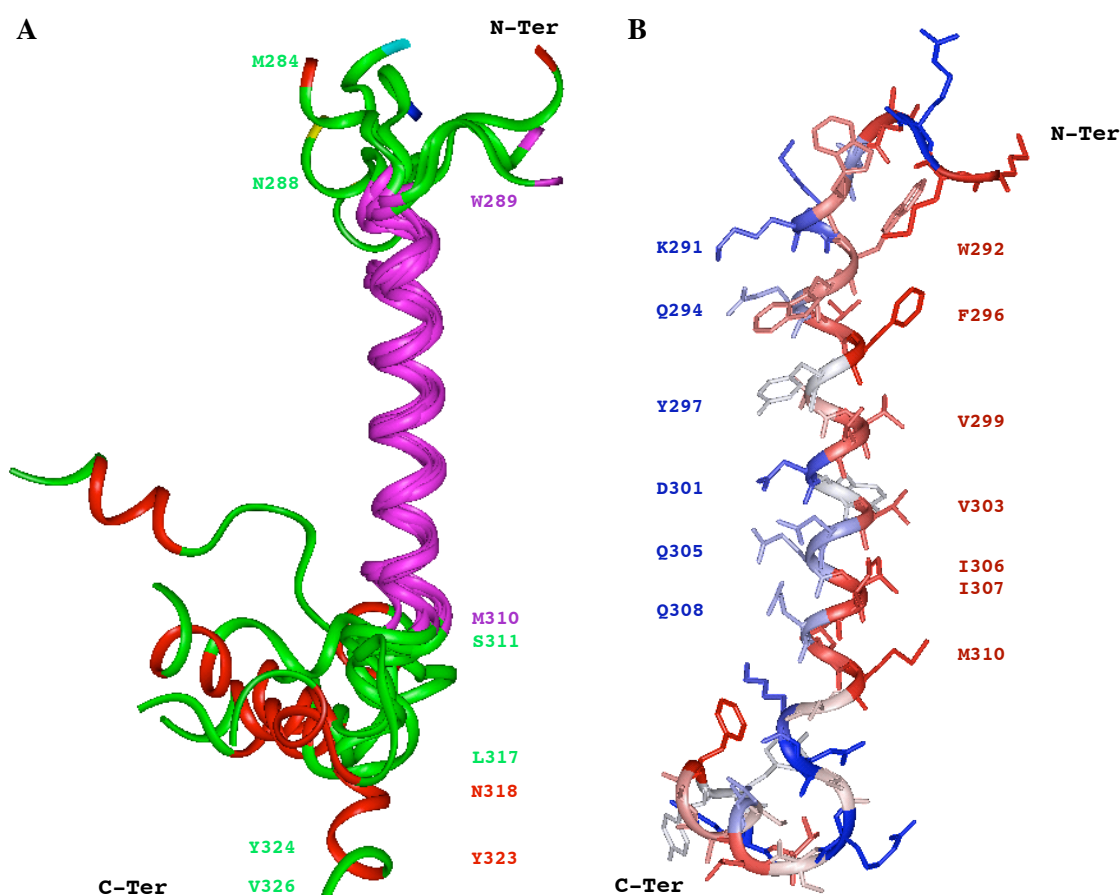


Figure V.2.2.2.1: Structure du peptide VP7₄₃ déterminée par RMN en présence des micelles de DPC

A. Superposition des 10 meilleures structures, de plus basse énergie, sur les atomes du squelette carboné W289-M310. **B.** Structure de plus faible énergie, montrant les propriétés amphiphiles de la grande hélice α , du résidu W289 au résidu M310. Les résidus sont colorés en fonction du caractère hydrophobe (rouge) ou hydrophile (bleu) des chaînes latérales des acides aminés.

V.2.2.3 Structure du peptide VP7₃₆

L'étude par RMN du peptide VP7₃₆ a été effectuée dans un mélange CD₃OH/CDCl₃ (1/1) et dans les micelles de DPC. Les résultats indiquent que ce peptide adopte une structure en hélice α amphiphile comprise entre les résidus W292 et M310 ou entre les résidus Q294 et M310 respectivement dans les DPC (Figure V.2.2.3.1) et le mélange CD₃OH/CDCl₃ (1/1) (Figure V.2.2.3.2). On observe également en C-terminal, une structure en hélice alpha dans le mélange CD₃OH/CDCl₃ (1/1) qui apparaît non structurée en présence de DPC. Cette hélice comporte les 10 derniers acides aminés de la protéine VP7, correspondant au peptide VP7₁₃, qui est inactif pour la déstabilisation des membranes.

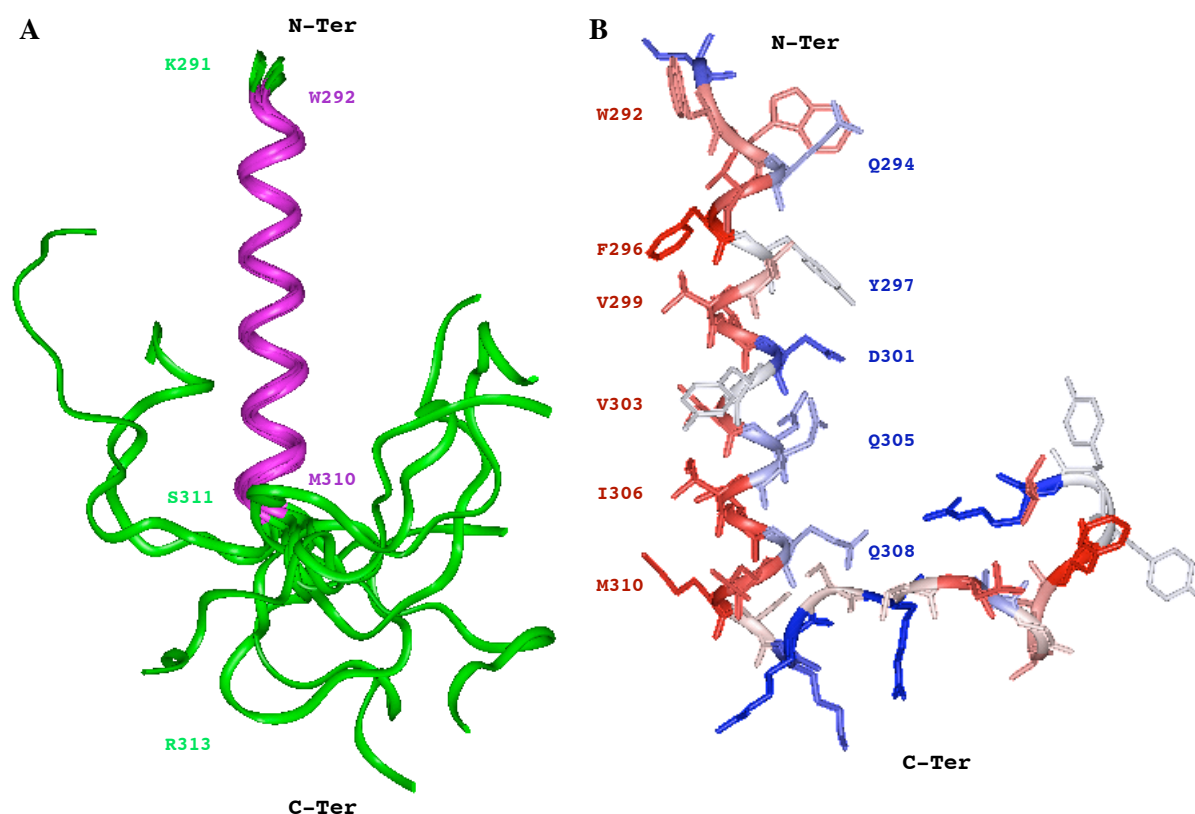


Figure V.2.2.3.1 : Structure du peptide VP7₃₆ déterminée par RMN en présence des micelles de DPC

A. Superposition des 10 meilleures structures, de plus basse énergie, sur les atomes du squelette carboné W292-M310. B. Structure de plus faible énergie, montrant les propriétés amphiphiles de la grande hélice α , le long des résidus W292 à M310. Les résidus sont colorés en fonction du caractère hydrophobe (rouge) ou hydrophile (bleu) des chaînes latérales des acides aminés.

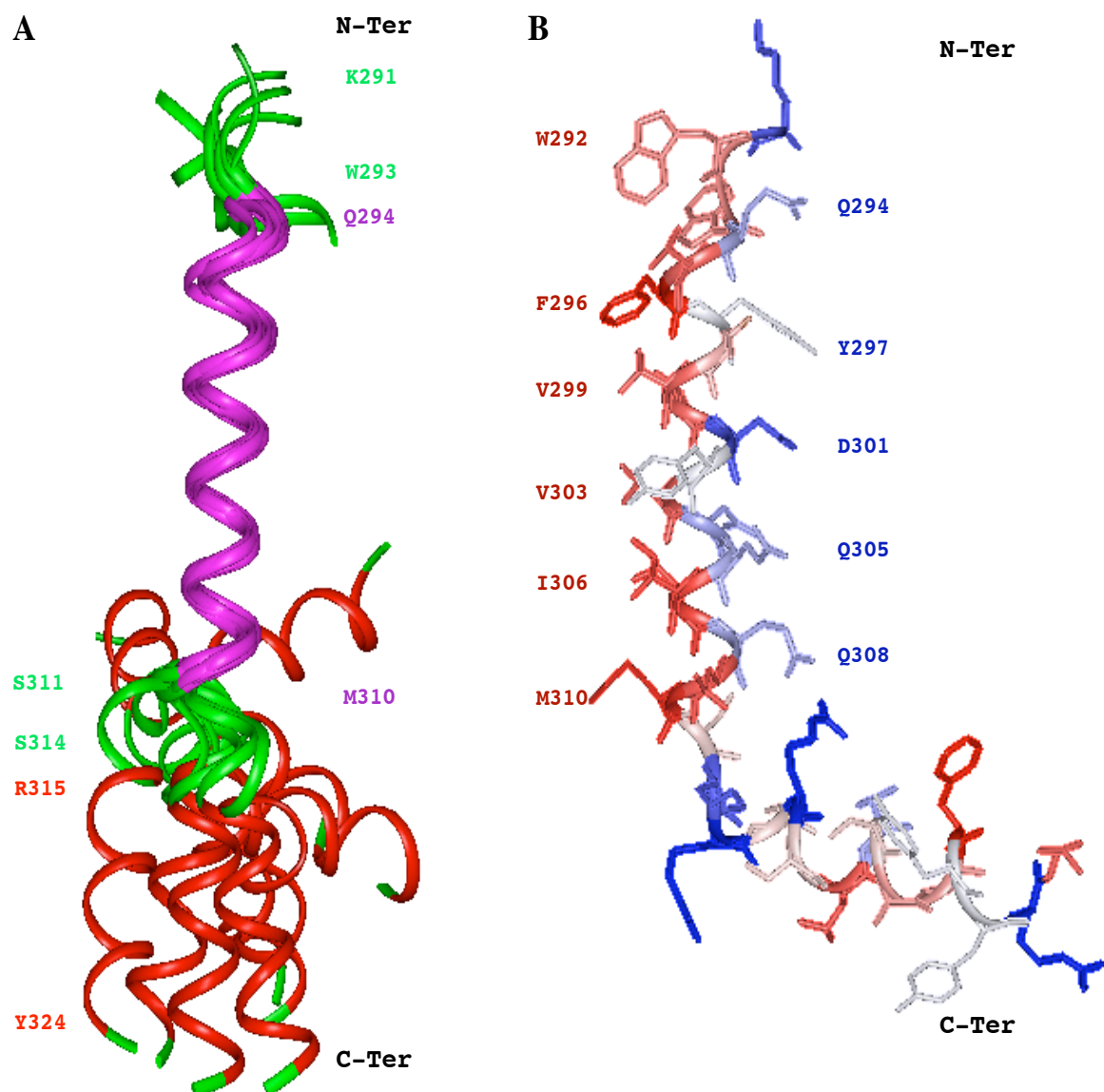


Figure V.2.2.3.2 : Structure du peptide VP7₃₆ déterminée par RMN en présence de CD₃OH/CDCl₃ (1/1) constituée par 2 hélices s'étendant sur les domaines (Q294-M310) et (R315-Y324).

A. Superposition des 10 meilleures structures, de plus basse énergie, sur les atomes du squelette carboné Q294-M310. **B.** Structure de plus faible énergie, montrant la plus grande hélice α , couvrant les résidus Q294 à M310 colorés en fonction du caractère hydrophobe (rouge) ou hydrophile (bleu) des chaînes latérales des acides aminés.

La caractérisation des propriétés physico- chimiques des peptides VP7₆₁, VP₄₃, VP₃₆ combinée aux études d'interaction avec des bicouches d'Egg PC comportant 20 % de didocylidiméthyl amonium bromide, lipides chargés positivement, par PWR, nous a conduit à suggérer que la première étape du mécanisme d'action de ces peptides, est une interaction électrostatique entre le peptide impliquant la face hydrophile du peptide et les têtes cholines de la membrane.

Chapitre VI: Bibliographie

VI. Bibliographie

- 1 Parashar, U. D., Hummelman, E. G., Bresee, J. S., Miller, M. A. & Glass, R. I. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis* **9**, 565-572 (2003).
- 2 Parashar, U. D., Gibson, C. J., Bresee, J. S. & Glass, R. I. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* **12**, 304-306 (2006).
- 3 Adams, W. R. & Kraft, L. M. Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent. *Science* **141**, 359-360 (1963).
- 4 Malherbe, H. H. & Strickland-Cholmley, M. Simian virus SA11 and the related O agent. *Arch Gesamte Virusforsch* **22**, 235-245 (1967).
- 5 Mebus, C. A., Underdahl, N. R., Rhodes, M. B. & Twiehaus, M. J. Further studies on neonatal calf diarrhea virus. *Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc* **73**, 97-99 (1969).
- 6 Bishop, R. F., Davidson, G. P., Holmes, I. H. & Ruck, B. J. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* **2**, 1281-1283 (1973).
- 7 Flewett, T. H. *et al.* RELATION BETWEEN VIRUSES FROM ACUTE GASTROENTERITIS OF CHILDREN AND NEWBORN CALVES. *The Lancet* **304**, 61-63 (1974).
- 8 Davidson, G. P., Gall, D. G., Petric, M., Butler, D. G. & Hamilton, J. R. Human rotavirus enteritis induced in conventional piglets. Intestinal structure and transport. *J Clin Invest* **60**, 1402-1409 (1977).
- 9 Jourdan, N. *et al.* Rotavirus is released from the apical surface of cultured human intestinal cells through nonconventional vesicular transport that bypasses the Golgi apparatus. *J Virol* **71**, 8268-8278 (1997).
- 10 Jourdan, N. *et al.* Rotavirus infection reduces sucrase-isomaltase expression in human intestinal epithelial cells by perturbing protein targeting and organization of microvillar cytoskeleton. *J Virol* **72**, 7228-7236 (1998).
- 11 Blutt, S. E. *et al.* Rotavirus antigenaemia and viraemia: a common event? *Lancet* **362**, 1445-1449 (2003).
- 12 Chiappini, E., Azzari, C., Moriondo, M., Galli, L. & de Martino, M. Viraemia is a common finding in immunocompetent children with rotavirus infection. *J Med Virol* **76**, 265-267 (2005).
- 13 Azevedo, M. S. *et al.* Viremia and nasal and rectal shedding of rotavirus in gnotobiotic pigs inoculated with Wa human rotavirus. *J Virol* **79**, 5428-5436 (2005).
- 14 Gaggero, A., Avendano, L. F., Fernandez, J. & Spencer, E. Nosocomial transmission of rotavirus from patients admitted with diarrhea. *J Clin Microbiol* **30**, 3294-3297 (1992).
- 15 Rzezutka, A. & Cook, N. Survival of human enteric viruses in the environment and food. *FEMS Microbiol Rev* **28**, 441-453 (2004).
- 16 Ansari, S. A., Sattar, S. A., Springthorpe, V. S., Wells, G. A. & Tostowaryk, W. Rotavirus survival on human hands and transfer of infectious virus to animate and nonporous inanimate surfaces. *J Clin Microbiol* **26**, 1513-1518 (1988).

- 17 Nicand, E., Tayssou, R. & Buisson, Y. Le risque fécal viral en 1998. *Virology* **2**, 103-116 (1998).
- 18 Ansari, S. A., Springthorpe, V. S. & Sattar, S. A. Survival and vehicular spread of human rotaviruses: possible relation to seasonality of outbreaks. *Rev Infect Dis* **13**, 448-461 (1991).
- 19 Berman, D. & Hoff, J. C. Inactivation of simian rotavirus SA11 by chlorine, chlorine dioxide, and monochloramine. *Appl Environ Microbiol* **48**, 317-323 (1984).
- 20 Gazal, S. *et al.* Ovine rotaviruses. *Open Veterinary Journal* **1**, 50-54 (2011).
- 21 Estes, M. K. & Cohen, J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev* **53**, 410-449 (1989).
- 22 Jayaram, H., Estes, M. K. & Prasad, B. V. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Res* **101**, 67-81 (2004).
- 23 Prasad, B. V., Wang, G. J., Clerx, J. P. & Chiu, W. Three-dimensional structure of rotavirus. *J Mol Biol* **199**, 269-275 (1988).
- 24 Lawton, J. A., Estes, M. K. & Prasad, B. V. V. Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nat Struct Mol Biol* **4**, 118-121 (1997).
- 25 Gouet, P. *et al.* The highly ordered double-stranded RNA genome of bluetongue virus revealed by crystallography. *Cell* **97**, 481-490 (1999).
- 26 Prasad, B. V. *et al.* Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. *Nature* **382**, 471-473 (1996).
- 27 Pesavento, J. B., Lawton, J. A., Estes, M. E. & Venkataram Prasad, B. V. The reversible condensation and expansion of the rotavirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1381-1386 (2001).
- 28 Yeager, M., Dryden, K. A., Olson, N. H., Greenberg, H. B. & Baker, T. S. Three-dimensional structure of rhesus rotavirus by cryoelectron microscopy and image reconstruction. *J Cell Biol* **110**, 2133-2144 (1990).
- 29 Crawford, S. E. *et al.* Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *J Virol* **68**, 5945-5952 (1994).
- 30 Lawton, J. A. *et al.* Three-dimensional structural analysis of recombinant rotavirus-like particles with intact and amino-terminal-deleted VP2: implications for the architecture of the VP2 capsid layer. *J Virol* **71**, 7353-7360 (1997).
- 31 Zeng, C. Q., Estes, M. K., Charpilienne, A. & Cohen, J. The N terminus of rotavirus VP2 is necessary for encapsidation of VP1 and VP3. *J Virol* **72**, 201-208 (1998).
- 32 Li, Z., Baker, M. L., Jiang, W., Estes, M. K. & Prasad, B. V. Rotavirus architecture at subnanometer resolution. *J Virol* **83**, 1754-1766 (2009).
- 33 Aoki, S. T. *et al.* Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab. *Science* **324**, 1444-1447 (2009).
- 34 Mathieu, M. *et al.* Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion. *Embo J* **20**, 1485-1497 (2001).
- 35 Dormitzer, P. R., Sun, Z. Y., Wagner, G. & Harrison, S. C. The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site. *Embo J* **21**, 885-897 (2002).
- 36 Dormitzer, P. R., Nason, E. B., Prasad, B. V. & Harrison, S. C. Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus. *Nature* **430**, 1053-1058 (2004).

- 37 Settembre, E. C., Chen, J. Z., Dormitzer, P. R., Grigorieff, N. & Harrison, S. C. Atomic model of an infectious rotavirus particle. *Embo J* **30**, 408-416 (2011).
- 38 McClain, B., Settembre, E., Temple, B. R., Bellamy, A. R. & Harrison, S. C. X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution. *J Mol Biol* **397**, 587-599 (2010).
- 39 Ericson, B. L., Graham, D. Y., Mason, B. B. & Estes, M. K. Identification, synthesis, and modifications of simian rotavirus SA11 polypeptides in infected cells. *J Virol* **42**, 825-839 (1982).
- 40 Hua, J., Mansell, E. A. & Patton, J. T. Comparative analysis of the rotavirus NS53 gene: conservation of basic and cysteine-rich regions in the protein and possible stem-loop structures in the RNA. *Virology* **196**, 372-378 (1993).
- 41 Hua, J., Chen, X. & Patton, J. T. Deletion mapping of the rotavirus metalloprotein NS53 (NSP1): the conserved cysteine-rich region is essential for virus-specific RNA binding. *J Virol* **68**, 3990-4000 (1994).
- 42 Bremont, M., Chabanne-Vautherot, D. & Cohen, J. Sequence analysis of three non structural proteins of a porcine group C (Cowden strain) rotavirus. *Arch Virol* **130**, 85-92 (1993).
- 43 Gonzalez, R. A., Torres-Vega, M. A., Lopez, S. & Arias, C. F. In vivo interactions among rotavirus nonstructural proteins. *Arch Virol* **143**, 981-996 (1998).
- 44 Mitchell, D. B. & Both, G. W. Conservation of a potential metal binding motif despite extensive sequence diversity in the rotavirus nonstructural protein NS53. *Virology* **174**, 618-621 (1990).
- 45 Graff, J. W., Ettayebi, K. & Hardy, M. E. Rotavirus NSP1 inhibits NFkappaB activation by inducing proteasome-dependent degradation of beta-TrCP: a novel mechanism of IFN antagonism. *PLoS Pathog* **5**, 30 (2009).
- 46 Jayaram, H., Taraporewala, Z., Patton, J. T. & Prasad, B. V. Rotavirus protein involved in genome replication and packaging exhibits a HIT-like fold. *Nature* **417**, 311-315 (2002).
- 47 Kattoura, M. D., Clapp, L. L. & Patton, J. T. The rotavirus nonstructural protein, NS35, possesses RNA-binding activity in vitro and in vivo. *Virology* **191**, 698-708 (1992).
- 48 Kattoura, M. D., Chen, X. & Patton, J. T. The rotavirus RNA-binding protein NS35 (NSP2) forms 10S multimers and interacts with the viral RNA polymerase. *Virology* **202**, 803-813 (1994).
- 49 Aponte, C., Poncet, D. & Cohen, J. Recovery and characterization of a replicase complex in rotavirus-infected cells by using a monoclonal antibody against NSP2. *J Virol* **70**, 985-991 (1996).
- 50 Fabbretti, E., Afrikanova, I., Vascotto, F. & Burrone, O. R. Two non-structural rotavirus proteins, NSP2 and NSP5, form viroplasm-like structures in vivo. *J Gen Virol* **80**, 333-339 (1999).
- 51 Poncet, D., Lindenbaum, P., L'Haridon, R. & Cohen, J. In vivo and in vitro phosphorylation of rotavirus NSP5 correlates with its localization in viroplasms. *J Virol* **71**, 34-41 (1997).
- 52 Mattion, N. M., Cohen, J., Aponte, C. & Estes, M. K. Characterization of an oligomerization domain and RNA-binding properties on rotavirus nonstructural protein NS34. *Virology* **190**, 68-83 (1992).

- 53 Jiang, X. *et al.* Cryoelectron microscopy structures of rotavirus NSP2-NSP5 and NSP2-RNA complexes: implications for genome replication. *J Virol* **80**, 10829-10835 (2006).
- 54 Taraporewala, Z. F. *et al.* Structure-function analysis of rotavirus NSP2 octamer by using a novel complementation system. *J Virol* **80**, 7984-7994 (2006).
- 55 Taraporewala, Z., Chen, D. & Patton, J. T. Multimers formed by the rotavirus nonstructural protein NSP2 bind to RNA and have nucleoside triphosphatase activity. *J Virol* **73**, 9934-9943 (1999).
- 56 Taraporewala, Z. F. & Patton, J. T. Nonstructural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae. *Virus Res* **101**, 57-66 (2004).
- 57 Poncet, D., Aponte, C. & Cohen, J. Rotavirus protein NSP3 (NS34) is bound to the 3' end consensus sequence of viral mRNAs in infected cells. *J Virol* **67**, 3159-3165 (1993).
- 58 Poncet, D., Laurent, S. & Cohen, J. Four nucleotides are the minimal requirement for RNA recognition by rotavirus non-structural protein NSP3. *Embo J* **13**, 4165-4173 (1994).
- 59 Piron, M., Vende, P., Cohen, J. & Poncet, D. Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *Embo J* **17**, 5811-5821 (1998).
- 60 Piron, M., Delaunay, T., Grosclaude, J. & Poncet, D. Identification of the RNA-binding, dimerization, and eIF4GI-binding domains of rotavirus nonstructural protein NSP3. *J Virol* **73**, 5411-5421 (1999).
- 61 Harb, M. *et al.* Nuclear localization of cytoplasmic poly(A)-binding protein upon rotavirus infection involves the interaction of NSP3 with eIF4G and RoXaN. *J Virol* **82**, 11283-11293 (2008).
- 62 Vitour, D., Lindenbaum, P., Vende, P., Becker, M. M. & Poncet, D. RoXaN, a novel cellular protein containing TPR, LD, and zinc finger motifs, forms a ternary complex with eukaryotic initiation factor 4G and rotavirus NSP3. *J Virol* **78**, 3851-3862 (2004).
- 63 Kang, H. J. *et al.* Differentially expressed proteins in gastrointestinal stromal tumors with KIT and PDGFRA mutations. *Proteomics* **6**, 1151-1157 (2006).
- 64 Ericson, B. L., Graham, D. Y., Mason, B. B., Hanssen, H. H. & Estes, M. K. Two types of glycoprotein precursors are produced by the simian rotavirus SA11. *Virology* **127**, 320-332 (1983).
- 65 Maass, D. R. & Atkinson, P. H. Rotavirus proteins VP7, NS28, and VP4 form oligomeric structures. *J Virol* **64**, 2632-2641 (1990).
- 66 Taylor, J. A., O'Brien, J. A. & Yeager, M. The cytoplasmic tail of NSP4, the endoplasmic reticulum-localized non-structural glycoprotein of rotavirus, contains distinct virus binding and coiled coil domains. *Embo J* **15**, 4469-4476 (1996).
- 67 Meyer, J. C., Bergmann, C. C. & Bellamy, A. R. Interaction of rotavirus cores with the nonstructural glycoprotein NS28. *Virology* **171**, 98-107 (1989).
- 68 Au, K. S., Chan, W. K., Burns, J. W. & Estes, M. K. Receptor activity of rotavirus nonstructural glycoprotein NS28. *J Virol* **63**, 4553-4562 (1989).
- 69 Taylor, J. A., O'Brien, J. A., Lord, V. J., Meyer, J. C. & Bellamy, A. R. The RER-localized rotavirus intracellular receptor: a truncated purified soluble form is multivalent and binds virus particles. *Virology* **194**, 807-814 (1993).

- 70 Poruchynsky, M. S. & Atkinson, P. H. Rotavirus protein rearrangements in purified membrane-enveloped intermediate particles. *J Virol* **65**, 4720-4727 (1991).
- 71 Poruchynsky, M. S., Maass, D. R. & Atkinson, P. H. Calcium depletion blocks the maturation of rotavirus by altering the oligomerization of virus-encoded proteins in the ER. *J Cell Biol* **114**, 651-656 (1991).
- 72 Silvestri, L. S., Tortorici, M. A., Vasquez-Del Carpio, R. & Patton, J. T. Rotavirus glycoprotein NSP4 is a modulator of viral transcription in the infected cell. *J Virol* **79**, 15165-15174 (2005).
- 73 Lopez, T. *et al.* Silencing the morphogenesis of rotavirus. *J Virol* **79**, 184-192 (2005).
- 74 Berkova, Z. *et al.* Rotavirus NSP4 induces a novel vesicular compartment regulated by calcium and associated with viroplasm. *J Virol* **80**, 6061-6071 (2006).
- 75 Dong, Y., Zeng, C. Q., Ball, J. M., Estes, M. K. & Morris, A. P. The rotavirus enterotoxin NSP4 mobilizes intracellular calcium in human intestinal cells by stimulating phospholipase C-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3960-3965 (1997).
- 76 Blackhall, J., Fuentes, A., Hansen, K. & Magnusson, G. Serine protein kinase activity associated with rotavirus phosphoprotein NSP5. *J Virol* **71**, 138-144 (1997).
- 77 Afrikanova, I., Miozzo, M. C., Giambiagi, S. & Burrone, O. Phosphorylation generates different forms of rotavirus NSP5. *J Gen Virol* **77**, 2059-2065 (1996).
- 78 Blackhall, J., Munoz, M., Fuentes, A. & Magnusson, G. Analysis of rotavirus nonstructural protein NSP5 phosphorylation. *J Virol* **72**, 6398-6405 (1998).
- 79 Welch, S. K., Crawford, S. E. & Estes, M. K. Rotavirus SA11 genome segment 11 protein is a nonstructural phosphoprotein. *J Virol* **63**, 3974-3982 (1989).
- 80 Lopez, T., Rojas, M., Ayala-Breton, C., Lopez, S. & Arias, C. F. Reduced expression of the rotavirus NSP5 gene has a pleiotropic effect on virus replication. *J Gen Virol* **86**, 1609-1617 (2005).
- 81 Campagna, M., Eichwald, C., Vascotto, F. & Burrone, O. R. RNA interference of rotavirus segment 11 mRNA reveals the essential role of NSP5 in the virus replicative cycle. *J Gen Virol* **86**, 1481-1487 (2005).
- 82 Bar-Magen, T., Spencer, E. & Patton, J. T. An ATPase activity associated with the rotavirus phosphoprotein NSP5. *Virology* **369**, 389-399 (2007).
- 83 Mattion, N. M., Mitchell, D. B., Both, G. W. & Estes, M. K. Expression of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment 11. *Virology* **181**, 295-304 (1991).
- 84 Rainsford, E. W. & McCrae, M. A. Characterization of the NSP6 protein product of rotavirus gene 11. *Virus Res* **130**, 193-201 (2007).
- 85 Mitchell, D. B. & Both, G. W. Completion of the genomic sequence of the simian rotavirus SA11: nucleotide sequences of segments 1, 2, and 3. *Virology* **177**, 324-331 (1990).
- 86 Cohen, J., Charpilienne, A., Chilmonczyk, S. & Estes, M. K. Nucleotide sequence of bovine rotavirus gene 1 and expression of the gene product in baculovirus. *Virology* **171**, 131-140 (1989).
- 87 Valenzuela, S. *et al.* Photoaffinity labeling of rotavirus VP1 with 8-azido-ATP: identification of the viral RNA polymerase. *J Virol* **65**, 3964-3967 (1991).

- 88 Gombold, J. L. & Ramig, R. F. Assignment of simian rotavirus SA11 temperature-sensitive mutant groups A, C, F, and G to genome segments. *Virology* **161**, 463-473 (1987).
- 89 Chen, D. & Patton, J. T. Rotavirus RNA replication requires a single-stranded 3' end for efficient minus-strand synthesis. *J Virol* **72**, 7387-7396 (1998).
- 90 Kumar, A., Charpilienne, A. & Cohen, J. Nucleotide sequence of the gene encoding for the RNA binding protein (VP2) of RF bovine rotavirus. *Nucleic Acids Res* **17** (1989).
- 91 Labbe, M., Baudoux, P., Charpilienne, A., Poncet, D. & Cohen, J. Identification of the nucleic acid binding domain of the rotavirus VP2 protein. *J Gen Virol* **75**, 3423-3430 (1994).
- 92 Liu, M., Mattion, N. M. & Estes, M. K. Rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity. *Virology* **188**, 77-84 (1992).
- 93 Pizarro, J. M., Pizarro, J. L., Fernandez, J., Sandino, A. M. & Spencer, E. Effect of nucleotide analogues on rotavirus transcription and replication. *Virology* **184**, 768-772 (1991).
- 94 Chen, D., Luongo, C. L., Nibert, M. L. & Patton, J. T. Rotavirus open cores catalyze 5'-capping and methylation of exogenous RNA: evidence that VP3 is a methyltransferase. *Virology* **265**, 120-130 (1999).
- 95 Patton, J. T. & Chen, D. RNA-binding and capping activities of proteins in rotavirus open cores. *J Virol* **73**, 1382-1391 (1999).
- 96 Prasad, B. V., Burns, J. W., Marietta, E., Estes, M. K. & Chiu, W. Localization of VP4 neutralization sites in rotavirus by three-dimensional cryo-electron microscopy. *Nature* **343**, 476-479 (1990).
- 97 Tihova, M., Dryden, K. A., Bellamy, A. R., Greenberg, H. B. & Yeager, M. Localization of membrane permeabilization and receptor binding sites on the VP4 hemagglutinin of rotavirus: implications for cell entry. *J Mol Biol* **314**, 985-992 (2001).
- 98 Crawford, S. E. *et al.* Trypsin cleavage stabilizes the rotavirus VP4 spike. *J Virol* **75**, 6052-6061 (2001).
- 99 Pesavento, J. B., Crawford, S. E., Roberts, E., Estes, M. K. & Prasad, B. V. pH-induced conformational change of the rotavirus VP4 spike: implications for cell entry and antibody neutralization. *J Virol* **79**, 8572-8580 (2005).
- 100 Yoder, J. D. & Dormitzer, P. R. Alternative intermolecular contacts underlie the rotavirus VP5* two- to three-fold rearrangement. *Embo J* **25**, 1559-1568 (2006).
- 101 Estes, M. K., Graham, D. Y. & Mason, B. B. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. *J Virol* **39**, 879-888 (1981).
- 102 Arias, C. F., Romero, P., Alvarez, V. & Lopez, S. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J Virol* **70**, 5832-5839 (1996).
- 103 Kaljot, K. T., Shaw, R. D., Rubin, D. H. & Greenberg, H. B. Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J Virol* **62**, 1136-1144 (1988).
- 104 Lopez, S. & Arias, C. F. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol* **12**, 271-278 (2004).
- 105 Hu, L. *et al.* Cell attachment protein VP8* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen. *Nature* **485**, 256-259 (2012).

- 106 Ludert, J. E., Ruiz, M. C., Hidalgo, C. & Liprandi, F. Antibodies to rotavirus outer capsid glycoprotein VP7 neutralize infectivity by inhibiting virion decapsidation. *J Virol* **76**, 6643-6651 (2002).
- 107 Enouf, V., Chwetzoff, S., Trugnan, G. & Cohen, J. Interactions of rotavirus VP4 spike protein with the endosomal protein Rab5 and the prenylated Rab acceptor PRA1. *J Virol* **77**, 7041-7047 (2003).
- 108 Delmas, O. *et al.* Different ways to reach the top of a cell. Analysis of rotavirus assembly and targeting in human intestinal cells reveals an original raft-dependent, Golgi-independent apical targeting pathway. *Virology* **327**, 157-161 (2004).
- 109 Zhang, X. *et al.* Near-atomic resolution using electron cryomicroscopy and single-particle reconstruction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 1867-1872 (2008).
- 110 Charpilienne, A., Lepault, J., Rey, F. & Cohen, J. Identification of rotavirus VP6 residues located at the interface with VP2 that are essential for capsid assembly and transcriptase activity. *J Virol* **76**, 7822-7831 (2002).
- 111 Both, G. W., Mattick, J. S. & Bellamy, A. R. Serotype-specific glycoprotein of simian 11 rotavirus: coding assignment and gene sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 3091-3095 (1983).
- 112 Arias, C. F., Lopez, S. & Espejo, R. T. Gene protein products of SA11 simian rotavirus genome. *J Virol* **41**, 42-50 (1982).
- 113 Stirzaker, S. C. & Both, G. W. The signal peptide of the rotavirus glycoprotein VP7 is essential for its retention in the ER as an integral membrane protein. *Cell* **56**, 741-747 (1989).
- 114 Kabcenell, A. K. & Atkinson, P. H. Processing of the rough endoplasmic reticulum membrane glycoproteins of rotavirus SA11. *J Cell Biol* **101**, 1270-1280 (1985).
- 115 Stirzaker, S. C., Whitfeld, P. L., Christie, D. L., Bellamy, A. R. & Both, G. W. Processing of rotavirus glycoprotein VP7: implications for the retention of the protein in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **105**, 2897-2903 (1987).
- 116 Maass, D. R. & Atkinson, P. H. Retention by the endoplasmic reticulum of rotavirus VP7 is controlled by three adjacent amino-terminal residues. *J Virol* **68**, 366-378 (1994).
- 117 Dyall-Smith, M. L., Lazdins, I., Tregear, G. W. & Holmes, I. H. Location of the major antigenic sites involved in rotavirus serotype-specific neutralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 3465-3468 (1986).
- 118 Coulson, B. S. & Kirkwood, C. Relation of VP7 amino acid sequence to monoclonal antibody neutralization of rotavirus and rotavirus monotype. *J Virol* **65**, 5968-5974 (1991).
- 119 Emslie, K. R., Coukell, M. B., Birch, D. & Williams, K. L. Calcium influences the stability and conformation of rotavirus SA11 glycoprotein VP7 expressed in *Dictyostelium discoideum*. *J Biotechnol* **50**, 149-159 (1996).
- 120 Dormitzer, P. R., Greenberg, H. B. & Harrison, S. C. Purified recombinant rotavirus VP7 forms soluble, calcium-dependent trimers. *Virology* **277**, 420-428 (2000).
- 121 Cohen, J., Laporte, J., Charpilienne, A. & Scherrer, R. Activation of rotavirus RNA polymerase by calcium chelation. *Arch Virol* **60**, 177-186 (1979).
- 122 Ruiz, M. C. *et al.* The concentration of Ca²⁺ that solubilizes outer capsid proteins from rotavirus particles is dependent on the strain. *J Virol* **70**, 4877-4883 (1996).
- 123 Shahrabadi, M. S., Babiuk, L. A. & Lee, P. W. Further analysis of the role of calcium in rotavirus morphogenesis. *Virology* **158**, 103-111 (1987).

- 124 Dormitzer, P. R. & Greenberg, H. B. Calcium chelation induces a conformational change in recombinant herpes simplex virus-1-expressed rotavirus VP7. *Virology* **189**, 828-832 (1992).
- 125 Ginn, D. I., Ward, R. L., Hamparian, V. V. & Hughes, J. H. Inhibition of rotavirus in vitro transcription by optimal concentrations of monoclonal antibodies specific for rotavirus VP6. *J Gen Virol* **73**, 3017-3022 (1992).
- 126 Lawton, J. A., Estes, M. K. & Prasad, B. V. Comparative structural analysis of transcriptionally competent and incompetent rotavirus-antibody complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5428-5433 (1999).
- 127 Thouvenin, E. *et al.* Antibody inhibition of the transcriptase activity of the rotavirus DLP: a structural view. *J Mol Biol* **307**, 161-172 (2001).
- 128 Charpilienne, A. *et al.* Solubilized and cleaved VP7, the outer glycoprotein of rotavirus, induces permeabilization of cell membrane vesicles. *J Gen Virol* **78**, 1367-1371 (1997).
- 129 Benureau, Y., Huet, J. C., Charpilienne, A., Poncet, D. & Cohen, J. Trypsin is associated with the rotavirus capsid and is activated by solubilization of outer capsid proteins. *J Gen Virol* **86**, 3143-3151 (2005).
- 130 Haselhorst, T. *et al.* Sialic acid dependence in rotavirus host cell invasion. *Nat Chem Biol* **5**, 91-93 (2009).
- 131 Lopez, S. & Arias, C. F. Early steps in rotavirus cell entry. *Curr Top Microbiol Immunol* **309**, 39-66 (2006).
- 132 Ruiz, M. C., Abad, M. J., Charpilienne, A., Cohen, J. & Michelangeli, F. Cell lines susceptible to infection are permeabilized by cleaved and solubilized outer layer proteins of rotavirus. *J Gen Virol* **78**, 2883-2893 (1997).
- 133 Coulson, B. S., Londrigan, S. L. & Lee, D. J. Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5389-5394 (1997).
- 134 Graham, K. L. *et al.* Integrin-using rotaviruses bind alpha2beta1 integrin alpha2 I domain via VP4 DGE sequence and recognize alphaXbeta2 and alphaVbeta3 by using VP7 during cell entry. *J Virol* **77**, 9969-9978 (2003).
- 135 Hewish, M. J., Takada, Y. & Coulson, B. S. Integrins alpha2beta1 and alpha4beta1 can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells. *J Virol* **74**, 228-236 (2000).
- 136 Guerrero, C. A. *et al.* Integrin alpha(v)beta(3) mediates rotavirus cell entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14644-14649 (2000).
- 137 Guerrero, C. A. *et al.* Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry. *J Virol* **76**, 4096-4102 (2002).
- 138 Zarate, S. *et al.* Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5. *J Virol* **77**, 7254-7260 (2003).
- 139 Zarate, S. *et al.* The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. *J Virol* **74**, 593-599 (2000).
- 140 Fuentes-Panana, E. M., Lopez, S., Gorziglia, M. & Arias, C. F. Mapping the hemagglutination domain of rotaviruses. *J Virol* **69**, 2629-2632 (1995).
- 141 Isa, P., Lopez, S., Segovia, L. & Arias, C. F. Functional and structural analysis of the sialic acid-binding domain of rotaviruses. *J Virol* **71**, 6749-6756 (1997).

- 142 Dormitzer, P. R. *et al.* Specificity and affinity of sialic acid binding by the rhesus rotavirus VP8* core. *J Virol* **76**, 10512-10517 (2002).
- 143 Mendez, E., Arias, C. F. & Lopez, S. Binding to sialic acids is not an essential step for the entry of animal rotaviruses to epithelial cells in culture. *J Virol* **67**, 5253-5259 (1993).
- 144 Ludert, J. E. *et al.* Identification of mutations in the rotavirus protein VP4 that alter sialic-acid-dependent infection. *J Gen Virol* **79**, 725-729 (1998).
- 145 Zarate, S. *et al.* Integrin alpha2beta1 mediates the cell attachment of the rotavirus neuraminidase-resistant variant nar3. *Virology* **278**, 50-54 (2000).
- 146 Perez-Vargas, J., Romero, P., Lopez, S. & Arias, C. F. The peptide-binding and ATPase domains of recombinant hsc70 are required to interact with rotavirus and reduce its infectivity. *J Virol* **80**, 3322-3331 (2006).
- 147 Zarate, S., Romero, P., Espinosa, R., Arias, C. F. & Lopez, S. VP7 mediates the interaction of rotaviruses with integrin alphavbeta3 through a novel integrin-binding site. *J Virol* **78**, 10839-10847 (2004).
- 148 Isa, P., Realpe, M., Romero, P., Lopez, S. & Arias, C. F. Rotavirus RRV associates with lipid membrane microdomains during cell entry. *Virology* **322**, 370-381 (2004).
- 149 Guerrero, C. A., Zarate, S., Corkidi, G., Lopez, S. & Arias, C. F. Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells. *J Virol* **74**, 9362-9371 (2000).
- 150 Cuadras, M. A., Arias, C. F. & Lopez, S. Rotaviruses induce an early membrane permeabilization of MA104 cells and do not require a low intracellular Ca²⁺ concentration to initiate their replication cycle. *J Virol* **71**, 9065-9074 (1997).
- 151 Nandi, P., Charpilienne, A. & Cohen, J. Interaction of rotavirus particles with liposomes. *J Virol* **66**, 3363-3367 (1992).
- 152 Ruiz, M. C. *et al.* Rotavirus interaction with isolated membrane vesicles. *J Virol* **68**, 4009-4016 (1994).
- 153 Falconer, M. M., Gilbert, J. M., Roper, A. M., Greenberg, H. B. & Gavora, J. S. Rotavirus-induced fusion from without in tissue culture cells. *J Virol* **69**, 5582-5591 (1995).
- 154 Mackow, E. R. *et al.* The rhesus rotavirus gene encoding protein VP3: location of amino acids involved in homologous and heterologous rotavirus neutralization and identification of a putative fusion region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 645-649 (1988).
- 155 Skehel, J. J. & Wiley, D. C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* **69**, 531-569 (2000).
- 156 Pereira, F. B., Goni, F. M., Muga, A. & Nieva, J. L. Permeabilization and fusion of uncharged lipid vesicles induced by the HIV-1 fusion peptide adopting an extended conformation: dose and sequence effects. *Biophys J* **73**, 1977-1986 (1997).
- 157 Denisova, E. *et al.* Rotavirus capsid protein VP5* permeabilizes membranes. *J Virol* **73**, 3147-3153 (1999).
- 158 Chemello, M. E., Aristimuno, O. C., Michelangeli, F. & Ruiz, M. C. Requirement for vacuolar H⁺ -ATPase activity and Ca²⁺ gradient during entry of rotavirus into MA104 cells. *J Virol* **76**, 13083-13087 (2002).
- 159 Wolf, M., Vo, P. T. & Greenberg, H. B. Rhesus rotavirus entry into a polarized epithelium is endocytosis dependent and involves sequential VP4 conformational changes. *J Virol* **85**, 2492-2503 (2011).

- 160 Singer, S. J. & Nicolson, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-731 (1972).
- 161 Estep, T. N., Mountcastle, D. B., Barenholz, Y., Biltonen, R. L. & Thompson, T. E. Thermal behavior of synthetic sphingomyelin-cholesterol dispersions. *Biochemistry* **18**, 2112-2117 (1979).
- 162 Simons, K. & Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572 (1997).
- 163 Brown, D. A. & London, E. Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes? *Biochem Biophys Res Commun* **240**, 1-7 (1997).
- 164 van Meer, G. Cellular lipidomics. *Embo J* **24**, 3159-3165 (2005).
- 165 van Meer, G. Lipids of the Golgi membrane. *Trends Cell Biol* **8**, 29-33 (1998).
- 166 van Meer, G., Voelker, D. R. & Feigenson, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 112-124 (2008).
- 167 Siegel, D. P. & Kozlov, M. M. The gaussian curvature elastic modulus of N-monomethylated dioleoylphosphatidylethanolamine: relevance to membrane fusion and lipid phase behavior. *Biophys J* **87**, 366-374 (2004).
- 168 Marsh, D. Lateral pressure profile, spontaneous curvature frustration, and the incorporation and conformation of proteins in membranes. *Biophys J* **93**, 3884-3899 (2007).
- 169 van Meer, G. & Lisman, Q. Sphingolipid transport: rafts and translocators. *J Biol Chem* **277**, 25855-25858 (2002).
- 170 van Meer, G. & Holthuis, J. C. Sphingolipid transport in eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta* **26**, 145-170 (2000).
- 171 Ohvo-Rekila, H., Ramstedt, B., Leppimäki, P. & Slotte, J. P. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog Lipid Res* **41**, 66-97 (2002).
- 172 Khelashvili, G., Pabst, G. & Harries, D. Cholesterol orientation and tilt modulus in DMPC bilayers. *J Phys Chem B* **114**, 7524-7534 (2010).
- 173 Yeagle, P. L. Cholesterol and the cell membrane. *Biochim Biophys Acta* **822**, 267-287 (1985).
- 174 Tang, Y., George, A., Taylor, T. & Hildreth, J. E. Cholesterol Depletion Inactivates XMRV and Leads to Viral Envelope Protein Release from Virions: Evidence for Role of Cholesterol in XMRV Infection. *PLoS One* **7**, 26 (2012).
- 175 Subtil, A. *et al.* Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6775-6780 (1999).
- 176 Rodal, S. K. *et al.* Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell* **10**, 961-974 (1999).
- 177 Lang, T. *et al.* SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *Embo J* **20**, 2202-2213 (2001).
- 178 van Meer, G., Gahmberg, C. G., Op den Kamp, J. A. & van Deenen, L. L. Phospholipid distribution in human En(a-) red cell membranes which lack the major sialoglycoprotein, glycophorin A. *FEBS Lett* **135**, 53-55 (1981).
- 179 Bretscher, M. S. Membrane structure: some general principles. *Science* **181**, 622-629 (1973).
- 180 Op den Kamp, J. A. Lipid asymmetry in membranes. *Annu Rev Biochem* **48**, 47-71 (1979).

- 181 Yeaman, M. R. & Yount, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev* **55**, 27-55 (2003).
- 182 Devaux, P. F. Protein involvement in transmembrane lipid asymmetry. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **21**, 417-439 (1992).
- 183 Seddon, J. M. Structure of the inverted hexagonal (HII) phase, and non-lamellar phase transitions of lipids. *Biochim Biophys Acta* **28**, 1-69 (1990).
- 184 Seddon, J. M., Hogan, J. L., Warrender, N. A. & Pebay-Peyroula, E. in *Trends in Colloid and Interface Science IV* Vol. 81 *Progress in Colloid & Polymer Science* (eds M. Zulauf, P. Lindner, & P. Terech) Ch. 38, 189-197 (Steinkopff, 1990).
- 185 Israelachvili, J. N. & Wennerstroem, H. Entropic forces between amphiphilic surfaces in liquids. *The Journal of Physical Chemistry* **96**, 520-531, doi:10.1021/j100181a007 (1992).
- 186 Israelachvili, J. N., Mitchell, D. J. & Ninham, B. W. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics* **72**, 1525-1568 (1976).
- 187 Angelova, M. I. & Dimitrov, D. S. Liposome electroformation. *Faraday Discussions of the Chemical Society* **81**, 303-311 (1986).
- 188 Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389-395 (2002).
- 189 Gordon, Y. J., Romanowski, E. G. & McDermott, A. M. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Curr Eye Res* **30**, 505-515 (2005).
- 190 Leontiadou, H., Mark, A. E. & Marrink, S. J. Antimicrobial peptides in action. *J Am Chem Soc* **128**, 12156-12161 (2006).
- 191 Galdiero, S. *et al.* Role of membranotropic sequences from herpes simplex virus type I glycoproteins B and H in the fusion process. *Biochim Biophys Acta* **3**, 579-591 (2010).
- 192 Lins, L., Decaffmeyer, M., Thomas, A. & Brasseur, R. Relationships between the orientation and the structural properties of peptides and their membrane interactions. *Biochim Biophys Acta*, 25 (2008).
- 193 Lins, L. & Brasseur, R. Tilted peptides: a structural motif involved in protein membrane insertion? *J Pept Sci* **14**, 416-422 (2008).
- 194 Henry, L. & Sheff, D. R. Rab8 regulates basolateral secretory, but not recycling, traffic at the recycling endosome. *Mol Biol Cell* **19**, 2059-2068 (2008).
- 195 Bulet, P., Stocklin, R. & Menin, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev* **198**, 169-184 (2004).
- 196 Tossi, A., Sandri, L. & Giangaspero, A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* **55**, 4-30 (2000).
- 197 Dasseux, J. L., Faucon, J. F., Lafleur, M., Pezolet, M. & Dufourcq, J. A restatement of melittin-induced effects on the thermotropism of zwitterionic phospholipids. *Biochim Biophys Acta* **775**, 37-50 (1984).
- 198 Bechinger, B. & Lohner, K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* **9**, 13 (2006).
- 199 Brogden, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* **3**, 238-250 (2005).
- 200 Chan, D. I., Prenner, E. J. & Vogel, H. J. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta* **9**, 21 (2006).

- 201 Sato, H. & Feix, J. B. Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* **9**, 12 (2006).
- 202 Pokorny, A. & Almeida, P. F. Kinetics of dye efflux and lipid flip-flop induced by delta-lysine in phosphatidylcholine vesicles and the mechanism of graded release by amphipathic, alpha-helical peptides. *Biochemistry* **43**, 8846-8857 (2004).
- 203 Pokorny, A. & Almeida, P. F. Permeabilization of raft-containing lipid vesicles by delta-lysine: a mechanism for cell sensitivity to cytotoxic peptides. *Biochemistry* **44**, 9538-9544 (2005).
- 204 Shai, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta* **15**, 1-2 (1999).
- 205 Matsuzaki, K., Murase, O., Fujii, N. & Miyajima, K. An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry* **35**, 11361-11368 (1996).
- 206 Heller, W. T., He, K., Ludtke, S. J., Harroun, T. A. & Huang, H. W. Effect of changing the size of lipid headgroup on peptide insertion into membranes. *Biophys J* **73**, 239-244 (1997).
- 207 Wu, Y., Huang, H. W. & Olah, G. A. Method of oriented circular dichroism. *Biophys J* **57**, 797-806 (1990).
- 208 Huang, H. W. & Wu, Y. Lipid-alamethicin interactions influence alamethicin orientation. *Biophys J* **60**, 1079-1087 (1991).
- 209 Huang, H. W. Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry* **39**, 8347-8352 (2000).
- 210 Glaser, R. W. *et al.* Concentration-dependent realignment of the antimicrobial peptide PGLa in lipid membranes observed by solid-state ¹⁹F-NMR. *Biophys J* **88**, 3392-3397 (2005).
- 211 Ludtke, S. J. *et al.* Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry* **35**, 13723-13728 (1996).
- 212 Sengupta, D., Leontiadou, H., Mark, A. E. & Marrink, S. J. Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder. *Biochim Biophys Acta* **10**, 18 (2008).
- 213 Bechinger, B. The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* **15**, 1-2 (1999).
- 214 Payne, J. W., Jakes, R. & Hartley, B. S. The primary structure of alamethicin. *Biochem J* **117**, 757-766 (1970).
- 215 Dave, P. C., Billington, E., Pan, Y. L. & Straus, S. K. Interaction of alamethicin with ether-linked phospholipid bilayers: oriented circular dichroism, ³¹P solid-state NMR, and differential scanning calorimetry studies. *Biophys J* **89**, 2434-2442 (2005).
- 216 He, K., Ludtke, S. J., Huang, H. W. & Worcester, D. L. Antimicrobial peptide pores in membranes detected by neutron in-plane scattering. *Biochemistry* **34**, 15614-15618 (1995).
- 217 Pokorny, A., Birkbeck, T. H. & Almeida, P. F. Mechanism and kinetics of delta-lysine interaction with phospholipid vesicles. *Biochemistry* **41**, 11044-11056 (2002).
- 218 Steiner, H., Andreu, D. & Merrifield, R. B. Binding and action of cecropin and cecropin analogues: antibacterial peptides from insects. *Biochim Biophys Acta* **939**, 260-266 (1988).

- 219 Sander, B. R. a. C. Progress of 1D Protein Structure Prediction at Last. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics* **23**, 295-300 (1995).
- 220 Liam J. McGuffin, K. B. a. D. T. J. The PSIPRED protein structure prediction server. *BIOINFORMATICS APPLICATIONS NOTE* **16**, 404–405 (1999).
- 221 Jones, D. T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol* **292**, 195-202 (1999).
- 222 Jones, D. T. GenTHREADER: an efficient and reliable protein fold recognition method for genomic sequences. *J Mol Biol* **287**, 797-815 (1999).
- 223 Jones, D. T., Taylor, W. R. & Thornton, J. M. A model recognition approach to the prediction of all-helical membrane protein structure and topology. *Biochemistry* **33**, 3038-3049 (1994).
- 224 Posthumus, M. A., Kistemaker, P. G., Meuzelaar, H. L. C. & Ten Noever de Brauw, M. C. Laser desorption-mass spectrometry of polar nonvolatile bio-organic molecules. *Analytical Chemistry* **50**, 985-991, doi:10.1021/ac50029a040 (1978).
- 225 Robert J. Lee, S. W., Mary Jo Turk, and Philip S. Low The Effects of pH and Intraliposomal Buffer Strength on the Rate of Liposome Content Release and Intracellular Drug Delivery. *Bioscience Reports* **18** (1998).
- 226 Rolf Jiricek, G. S., Toon Stegmann. Pores formed by influenza hemagglutinin. *Biochimica et Biophysica Acta* **1330**, 17 – 28 (1997).
- 227 Schwarz, S. R. a. G. Quantitative Studies on the Melittin-Induced Leakage Mechanism of Lipid Vesicles. *Biochemistry* **37**, 2336-2345 (1998).
- 228 Parra, A. d. I. M. a. J. L. Solubilizing Effects Caused by the Nonionic Surfactant Dodecylmaltoside in Phosphatidylcholine Liposomes. *Biophysical Journal* **72**, 1668-1675 (1997).
- 229 Ortiz, A., Teruel, J. A. & Aranda, F. J. Effect of triorganotin compounds on membrane permeability. *Biochim Biophys Acta* **1720**, 137-142, doi:10.1016/j.bbamem.2005.12.005 (2005).
- 230 Zdzislaw Salamon, H. A. M., and Gordon Tollin. Coupled Plasmon-Waveguide Resonators: A New Spectroscopic Tool for Probing Proteolipid Film Structure and Properties. *Biophysical Journal* **73**, 2791-2797 (1997).
- 231 Hruby, V. J., Alves, I., Cowell, S., Salamon, Z. & Tollin, G. Use of plasmon waveguide resonance (PWR) spectroscopy for examining binding, signaling and lipid domain partitioning of membrane proteins. *Life sciences* **86**, 569-574, doi:10.1016/j.lfs.2009.02.027 (2010).
- 232 Tollin, Z. S. a. G. Graphical Analysis of Mass and Anisotropy Changes Observed by Plasmon-Waveguide Resonance Spectroscopy Can Provide Useful Insights into Membrane Protein Function. *Biophysical Journal* **86**, 2508–2516 (2004).
- 233 Biot, J.-B. mémoire sur les rotations que certaines substances impriment aux axes de polarisation des rayons lumineux. *Mémoires de l'académie royale des sciences de l'institut de france* **2**, 42 (1817).
- 234 Fresnel, A. Mémoire sur la double réfraction. (1822).
- 235 Pasteur, L. Nouvelles recherches sur les relations qui peuvent exister entre la forme cristalline, la composition chimique, et le pouvoir rotatoire moléculaire. . 67_82 (1849).

- 236 Chen, Y. H., Yang, J. T. & Chau, K. H. Determination of the helix and beta form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. *Biochemistry* **13**, 3350-3359 (1974).
- 237 Rabi, I., Zacharias, J. R., Millman, S. & Kusch, P. Milestones in magnetic resonance: 'a new method of measuring nuclear magnetic moment' . 1938. *J Magn Reson Imaging* **2**, 131-133 (1992).
- 238 Purcell, E., H. Torrey, and R. Pound. Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. *Phys. Rev* **69**, 37-38 (1946).
- 239 Bloch, F., W. Hansen, and M. Packard. Nuclear Induction. *Phys. Rev* **69**, 127 (1946).
- 240 Proctor, W. G. & Yu, F. C. The Dependence of a Nuclear Magnetic Resonance Frequency upon Chemical Compound. *Physical Review* **77**, 717-717 (1950).
- 241 Osapay, K. & Case, D. A. Analysis of proton chemical shifts in regular secondary structure of proteins. *J Biomol NMR* **4**, 215-230 (1994).
- 242 Wüthrich, K. NMR of Proteins and Nucleic Acids. (1986).
- 243 F. CREUZET, A. M., t R. GEBHARD, K. VAN DER HOEF, M. B. SPIJKER-ASSINK, J. HERZFELD, J. LUGTENBURG, M. H. LEVrIT,t R. G. GRIFFIN. Determination of Membrane Protein Structure by Rotational Resonance NMR: Bacteriorhodopsin. *Science* **251**, 783-786 (1991).
- 244 Pardi, A., Wagner, G. & Wuthrich, K. Protein conformation and proton nuclear-magnetic-resonance chemical shifts. *Eur J Biochem* **137**, 445-454 (1983).
- 245 Oshiro, C. M., Thomason, J. & Kuntz, I. D. Effects of limited input distance constraints upon the distance geometry algorithm. *Biopolymers* **31**, 1049-1064 (1991).
- 246 K. WUTHRICH, M. B. A. W. B. Pseudo-structures for the 20 Common Amino Acids for Use in Studies of Protein Conformations by Measurements of Intramolecular Proton-Proton Distance Constraints with Nuclear Magnetic Resonance *J. Mol. Biol* **169** 949-961 (1983).
- 247 KURT WÜTHRICH, M. B. A. W. B. Polypeptide Secondary Structure Determination by Nuclear Magnetic Resonance Observation of Short Proton-Proton Distances. *J. Mol. Biol* **180**, 715-740 (1984).
- 248 Vladimir S. Pashkov, I. V. M., Leonid D. Tchikin, Roman G. Efremov, & Vadim T. Ivanov, A. S. A. Spatial structure of the M2 transmembrane segment of the nicotinic acetylcholine receptor K-subunit. *FEBS Letters* **457**, 117-121 (1999).
- 249 Vladislav Yu. Orekhov, P. V. D., Hiroaki Yamada , Kazuyuki Akasaka, & Arseniev, A. S. Pressure effect on the dynamics of an isolated α -helix studied by ^{15}N - ^1H NMR relaxation. *Journal of Biomolecular NMR* **17**, 257–263 (2000).
- 250 Opella, S. J. NMR and membrane proteins. *Nat Struct Biol* **4**, 845-848 (1997).
- 251 Nilges, M. Calculation of protein structures with ambiguous distance restraints. Automated assignment of ambiguous NOE crosspeaks and disulphide connectivities. *J Mol Biol* **245**, 645-660 (1995).
- 252 Linge, J. P., Habeck, M., Rieping, W. & Nilges, M. ARIA: automated NOE assignment and NMR structure calculation. *Bioinformatics* **19**, 315-316 (2003).
- 253 Linge, J. P., O'Donoghue, S. I. & Nilges, M. Automated assignment of ambiguous nuclear overhauser effects with ARIA. *Methods Enzymol* **339**, 71-90 (2001).
- 254 Ramachandran, G. N., Chandrasekaran, R. & Kopple, K. D. Variation of the NH-C alpha-H coupling constant with dihedral angle in the NMR spectra of peptides. *Biopolymers* **10**, 2113-2131 (1971).

- 255 Ludert, J. E., Krishnaney, A. A., Burns, J. W., Vo, P. T. & Greenberg, H. B. Cleavage of rotavirus VP4 in vivo. *J Gen Virol* **77**, 391-395 (1996).
- 256 Gilber, J. M., Feng, N., Patton, J. T. & Greenberg, H. B. Rotavirus assembly - interaction of surface protein VP7 with middle layer protein VP6. *Arch Virol* **146**, 1155-1171 (2001).
- 257 Trask, S. D., Kim, I. S., Harrison, S. C. & Dormitzer, P. R. A rotavirus spike protein conformational intermediate binds lipid bilayers. *J Virol* **84**, 1764-1770 (2010).
- 258 Gasteiger, E. *et al.* (ed John M. Walker) 571-607 (Humana Press, 2005).
- 259 Simmaco, M., Mignogna, G. & Barra, D. Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us? *Biopolymers* **47**, 435-450 (1998).
- 260 Feigin, A. M., Teeter, J. H. & Brand, J. G. The influence of sterols on the sensitivity of lipid bilayers to melittin. *Biochem Biophys Res Commun* **211**, 312-317 (1995).
- 261 Valcarcel, C. A. *et al.* Effects of lipid composition on membrane permeabilization by sticholysin I and II, two cytolytins of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biophys J* **80**, 2761-2774 (2001).
- 262 Henzler Wildman, K. A., Lee, D. K. & Ramamoorthy, A. Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, LL-37. *Biochemistry* **42**, 6545-6558 (2003).
- 263 Evans, E. A. & Waugh, R. Mechano-chemistry of closed, vesicular membrane systems. *Journal of Colloid and Interface Science* **60**, 286-298, doi:10.1016/0021-9797(77)90288-0 (1977).
- 264 Salamon, Z., Brown, M. F. & Tollin, G. Plasmon resonance spectroscopy: probing molecular interactions within membranes. *Trends Biochem Sci* **24**, 213-219 (1999).
- 265 Mueller, P., Rudin, D. O., Tien, H. T. & Wescott, W. C. Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. *Nature* **194**, 979-980 (1962).
- 266 Salamon, Z., Lindblom, G., Rilfors, L., Linde, K. & Tollin, G. Interaction of phosphatidylserine synthase from *E. coli* with lipid bilayers: coupled plasmon-waveguide resonance spectroscopy studies. *Biophys J* **78**, 1400-1412 (2000).
- 267 Salamon, Z. & Tollin, G. Optical anisotropy in lipid bilayer membranes: coupled plasmon-waveguide resonance measurements of molecular orientation, polarizability, and shape. *Biophys J* **80**, 1557-1567 (2001).
- 268 Salamon, Z., Hruby, V. J., Tollin, G. & Cowell, S. Binding of agonists, antagonists and inverse agonists to the human delta-opioid receptor produces distinctly different conformational states distinguishable by plasmon-waveguide resonance spectroscopy. *J Pept Res* **60**, 322-328 (2002).
- 269 Alves, I. D. *et al.* Direct observation of G-protein binding to the human delta-opioid receptor using plasmon-waveguide resonance spectroscopy. *J Biol Chem* **278**, 48890-48897 (2003).
- 270 Dhanasekaran, M. *et al.* Glycopeptides related to beta-endorphin adopt helical amphipathic conformations in the presence of lipid bilayers. *J Am Chem Soc* **127**, 5435-5448 (2005).
- 271 Zheng, Y.-J. & Ornstein, R. L. A Molecular Dynamics and Quantum Mechanics Analysis of the Effect of DMSO on Enzyme Structure and Dynamics: Subtilisin. *Journal of the American Chemical Society* **118**, 4175-4180, doi:10.1021/ja9539195 (1996).

- 272 Duarte, A. M., van Mierlo, C. P. & Hemminga, M. A. Molecular dynamics study of the solvation of an alpha-helical transmembrane peptide by DMSO. *J Phys Chem B* **112**, 8664-8671 (2008).
- 273 Devanathan, S., Salamon, Z., Lindblom, G., Grobner, G. & Tollin, G. Effects of sphingomyelin, cholesterol and zinc ions on the binding, insertion and aggregation of the amyloid Abeta(1-40) peptide in solid-supported lipid bilayers. *Febs J* **273**, 1389-1402 (2006).
- 274 Salgado, G. F. *et al.* The role of membranes in the organization of HIV-1 Gag p6 and Vpr: p6 shows high affinity for membrane bilayers which substantially increases the interaction between p6 and Vpr. *J Med Chem* **52**, 7157-7162 (2009).
- 275 Galloux, M. *et al.* NMR structure of a viral peptide inserted in artificial membranes: a view on the early steps of the birnavirus entry process. *J Biol Chem* **285**, 19409-19421 (2010).
- 276 Matsuzaki, K., Sugishita, K., Fujii, N. & Miyajima, K. Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, magainin 2. *Biochemistry* **34**, 3423-3429 (1995).
- 277 Raghuraman, H. & Chattopadhyay, A. Interaction of melittin with membrane cholesterol: a fluorescence approach. *Biophys J* **87**, 2419-2432 (2004).
- 278 Glukhov, E., Stark, M., Burrows, L. L. & Deber, C. M. Basis for selectivity of cationic antimicrobial peptides for bacterial versus mammalian membranes. *J Biol Chem* **280**, 33960-33967 (2005).
- 279 Verly, R. M. *et al.* Effect of cholesterol on the interaction of the amphibian antimicrobial peptide DD K with liposomes. *Peptides* **29**, 15-24 (2008).
- 280 Wu, G. *et al.* Selective toxicity of antimicrobial peptide S-thanatin on bacteria. *Peptides* **31**, 1669-1673 (2010).
- 281 Tytler, E. M. *et al.* Molecular basis for prokaryotic specificity of magainin-induced lysis. *Biochemistry* **34**, 4393-4401 (1995).
- 282 Henriksen, J. *et al.* Universal behavior of membranes with sterols. *Biophys J* **90**, 1639-1649 (2006).
- 283 Ramamoorthy, A., Lee, D. K., Narasimhaswamy, T. & Nanga, R. P. Cholesterol reduces pardaxin's dynamics-a barrel-stave mechanism of membrane disruption investigated by solid-state NMR. *Biochim Biophys Acta* **2**, 223-227 (2010).
- 284 Mechin, L., Dubois-Brissonnet, F., Heyd, B. & Leveau, J. Y. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 to didecyldimethylammonium bromide induces changes in membrane fatty acid composition and in resistance of cells. *J Appl Microbiol* **86**, 859-866 (1999).
- 285 Matsuzaki, K. *et al.* Modulation of magainin 2-lipid bilayer interactions by peptide charge. *Biochemistry* **36**, 2104-2111 (1997).
- 286 Salditt, T., Li, C. & Spaar, A. Structure of antimicrobial peptides and lipid membranes probed by interface-sensitive X-ray scattering. *Biochim Biophys Acta* **9**, 12 (2006).
- 287 Matsuzaki, K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim Biophys Acta* **15**, 1-2 (1999).
- 288 Huang, J. & Feigenson, G. W. A microscopic interaction model of maximum solubility of cholesterol in lipid bilayers. *Biophys J* **76**, 2142-2157 (1999).
- 289 Abrunhosa, F. *et al.* Interaction and lipid-induced conformation of two cecropin-melittin hybrid peptides depend on peptide and membrane composition. *J Phys Chem B* **109**, 17311-17319 (2005).

- 290 Chen, Y. H., Yang, J. T. & Martinez, H. M. Determination of the secondary structures of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion. *Biochemistry* **11**, 4120-4131 (1972).
- 291 Orekhov, V. Y., Dubovskii, P. V., Yamada, H., Akasaka, K. & Arseniev, A. S. Pressure effect on the dynamics of an isolated alpha-helix studied by ¹⁵N-¹H NMR relaxation. *J Biomol NMR* **17**, 257-263 (2000).
- 292 Pashkov, V. S. *et al.* Spatial structure of the M2 transmembrane segment of the nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunit. *FEBS Lett* **457**, 117-121 (1999).
- 293 Sanders, C. R. & Oxenoid, K. Customizing model membranes and samples for NMR spectroscopic studies of complex membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* **23**, 1-2 (2000).
- 294 Fernandez, C. & Wuthrich, K. NMR solution structure determination of membrane proteins reconstituted in detergent micelles. *FEBS Lett* **555**, 144-150 (2003).
- 295 Beswick, V. *et al.* ¹H- and ²H-NMR studies of a fragment of PMP1, a regulatory subunit associated with the yeast plasma membrane H(+)-ATPase. Conformational properties and lipid-peptide interactions. *Biochimie* **80**, 451-459 (1998).
- 296 Beswick, V. *et al.* Dodecylphosphocholine micelles as a membrane-like environment: new results from NMR relaxation and paramagnetic relaxation enhancement analysis. *Eur Biophys J* **28**, 48-58 (1999).
- 297 Wishart, D. S., Bigam, C. G., Holm, A., Hodges, R. S. & Sykes, B. D. ¹H, ¹³C and ¹⁵N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects. *J Biomol NMR* **5**, 67-81 (1995).
- 298 Raghuraman, H. & Chattopadhyay, A. Melittin: a membrane-active peptide with diverse functions. *Biosci Rep* **27**, 189-223 (2007).
- 299 Seil, M., Nagant, C., Dehay, J.-P., Vandenbranden, M. & Lensink, M. F. Spotlight on Human LL-37, an Immunomodulatory Peptide with Promising Cell-Penetrating Properties. *Pharmaceuticals* **3**, 3435-3460 (2010).
- 300 Sivakamasundari, C. & Nagaraj, R. Interaction of 18-residue peptides derived from amphipathic helical segments of globular proteins with model membranes. *J Biosci* **34**, 239-250 (2009).
- 301 Galanth, C. *et al.* Mechanism of antibacterial action of dermaseptin B2: interplay between helix-hinge-helix structure and membrane curvature strain. *Biochemistry* **48**, 313-327 (2009).
- 302 Oren, Z. & Shai, Y. Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* **47**, 451-463 (1998).
- 303 Yohannan, S., Faham, S., Yang, D., Whitelegge, J. P. & Bowie, J. U. The evolution of transmembrane helix kinks and the structural diversity of G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 959-963 (2004).
- 304 Reiersen, H. & Rees, A. R. The hunchback and its neighbours: proline as an environmental modulator. *Trends Biochem Sci* **26**, 679-684 (2001).
- 305 Rajashankar, K. R. & Ramakumar, S. Pi-turns in proteins and peptides: Classification, conformation, occurrence, hydration and sequence. *Protein Sci* **5**, 932-946 (1996).
- 306 Krieger, F., Moglich, A. & Kiefhaber, T. Effect of proline and glycine residues on dynamics and barriers of loop formation in polypeptide chains. *J Am Chem Soc* **127**, 3346-3352 (2005).
- 307 Kang, Y. K. & Choi, H. Y. Cis-trans isomerization and puckering of proline residue. *Biophys Chem* **111**, 135-142 (2004).

- 308 Grathwohl, C. & Wuthrich, K. The X-Pro peptide bond as an nmr probe for conformational studies of flexible linear peptides. *Biopolymers* **15**, 2025-2041 (1976).
- 309 Harrison, R. K. & Stein, R. L. Mechanistic studies of peptidyl prolyl cis-trans isomerase: evidence for catalysis by distortion. *Biochemistry* **29**, 1684-1689 (1990).
- 310 Harrison, R. K. & Stein, R. L. Substrate specificities of the peptidyl prolyl cis-trans isomerase activities of cyclophilin and FK-506 binding protein: evidence for the existence of a family of distinct enzymes. *Biochemistry* **29**, 3813-3816 (1990).
- 311 O'Neal, K. D. *et al.* Multiple cis-trans conformers of the prolactin receptor proline-rich motif (PRM) peptide detected by reverse-phase HPLC, CD and NMR spectroscopy. *Biochem J* **315**, 833-844 (1996).
- 312 Arora, A., Abildgaard, F., Bushweller, J. H. & Tamm, L. K. Structure of outer membrane protein A transmembrane domain by NMR spectroscopy. *Nat Struct Biol* **8**, 334-338 (2001).
- 313 Tamm, L. K., Abildgaard, F., Arora, A., Blad, H. & Bushweller, J. H. Structure, dynamics and function of the outer membrane protein A (OmpA) and influenza hemagglutinin fusion domain in detergent micelles by solution NMR. *FEBS Lett* **555**, 139-143 (2003).
- 314 Wang, G. *et al.* Structure, dynamics, and antimicrobial and immune modulatory activities of human LL-23 and its single-residue variants mutated on the basis of homologous primate cathelicidins. *Biochemistry* **51**, 653-664 (2012).
- 315 Galdiero, S. *et al.* Structure and orientation of the gH625-644 membrane interacting region of herpes simplex virus type 1 in a membrane mimetic system. *Biochemistry* **51**, 3121-3128 (2012).
- 316 Mohanram, H., Nip, A., Domadia, P. N., Bhunia, A. & Bhattacharjya, S. NMR structure, localization, and vesicle fusion of chikungunya virus fusion Peptide. *Biochemistry* **51**, 7863-7872 (2012).
- 317 Dathe, M. & Wieprecht, T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochim Biophys Acta* **15**, 1-2 (1999).
- 318 Hancock, R. E. & Sahl, H. G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol* **24**, 1551-1557 (2006).
- 319 Bjorstad, A. *et al.* The host defense peptide LL-37 selectively permeabilizes apoptotic leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 1027-1038 (2009).
- 320 Turner, J., Cho, Y., Dinh, N. N., Waring, A. J. & Lehrer, R. I. Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 2206-2214 (1998).
- 321 Andersson, M., Boman, A. & Boman, H. G. Ascaris nematodes from pig and human make three antibacterial peptides: isolation of cecropin P1 and two ASABF peptides. *Cell Mol Life Sci* **60**, 599-606 (2003).
- 322 Gerasimenko, J. V., Tepikin, A. V., Petersen, O. H. & Gerasimenko, O. V. Calcium uptake via endocytosis with rapid release from acidifying endosomes. *Curr Biol* **8**, 1335-1338 (1998).
- 323 Golantsova, N. E., Gorbunova, E. E. & Mackow, E. R. Discrete domains within the rotavirus VP5* direct peripheral membrane association and membrane permeability. *J Virol* **78**, 2037-2044 (2004).

Résumé de thèse

Détermination du mécanisme d'entrée du Rotavirus, impliquant la glycoprotéine VP7.

Les Rotavirus appartiennent à la famille des Reoviridae, famille du groupe III des virus à ARN double brin. Identifiés en 1973 par Ruth Bishop, ces virus non enveloppés sont la première cause de diarrhée aiguë sévère du jeune enfant dans le monde. La capside virale icosaédrique est constituée de 3 couches protéiques de structure : la couche externe formée par la glycoprotéine VP7 d'où émergent les spicules de protéine VP4, la couche intermédiaire constituée par la protéine VP6 représentant près de 50 % du poids du virus et enfin, la couche interne appelée core, résultant de l'assemblage des protéines VP2, d'où émergent vers l'intérieur les protéines VP1 et VP3. Cette capside renferme un génome divisé en 11 segments d'ARN bicaténaires. A ces 6 protéines structurales s'ajoutent les protéines non structurales qui interviennent lors de la réplication du virus. Les deux protéines structurales, VP4 et VP7 sont essentielles pour la fixation de la particule triple couche (TLP) aux membranes des cellules hôtes, par interaction aux récepteurs intégrines, elle sont également impliqués dans la déstabilisation des membranes endosomales, indispensable à la libération de la particule double couche (DLP) infectieuse dans le cytoplasme. Actuellement, contrairement au mécanisme d'action de la protéine VP5*, celui de la glycoprotéine VP7 est inconnu.

L'objectif de cette thèse, a été de comprendre le mécanisme moléculaire de déstabilisation des membranes par les peptides dérivés de VP7. Dans un premier temps nous avons montré, par des études *in silico*, l'existence d'un domaine prédit en hélice membranaire bordé de résidus arginine et lysine hautement conservés, situé à l'extrémité C-terminale de la glycoprotéine VP7. Ces résultats ont conduit à la synthèse de quatre peptides avec lesquels des tests de perméabilisation de membranes modèles de larges vésicules unilamellaires (LUVs) ont été menés. Ceux-ci ont permis d'identifier le domaine minimum le plus actif, VP723, parmi les peptides sélectionnés. Dans un second temps nous avons déterminé la structure de ces peptides par RMN, dans des conditions mimant l'environnement hydrophobe de la membrane. Le peptide minimal VP723 s'organise en hélice α -amphipathique, structure souvent impliquée dans la déstabilisation des membranes cellulaires. La comparaison de sa structure obtenue par RMN à celle du domaine correspondant dans la structure cristallographique de la protéine native montre le réarrangement conformationnel de ce segment après maturation par la trypsine. Ces résultats ont été confirmés par deux mutants de synthèse, dont l'un est inactif pour la perméabilisation des membranes modèles. Ces travaux ont été complétés par des expériences de Résonance Plasmonique aux Ondes guidée (PWR). Des études par RMN du solide sont en cours afin de déterminer l'orientation du peptide dans les membranes modèles.

En conclusion, nos résultats mettent en évidence l'importance du domaine C-terminal VP723 de la protéine VP7 dans la déstabilisation des membranes, permettant d'assurer la translocation de la particule virale infectieuse (DLP) de l'endosome vers le cytoplasme. Un modèle du mécanisme d'entrée du virus, médié par les peptides dérivés de la maturation par la trypsine de la glycoprotéine VP7 est proposé.

Mots clés: Rotavirus; glycoprotéine VP7, entrée, peptide perforateur de membrane; perméabilisation des membranes; réarrangement conformationnel, PWR, RMN, ATR-FTIR, dichroïsme circulaire, cryomicroscopie électronique.